



Universitat de Girona

# ESTUDI DE LA MOBILITAT I BIODISPONIBILITAT DE POL·LUENTS EN LA ZONA MINERA DEL CAMP DE CARTAGENA

**Marta SÁNCHEZ I BASSOLS**

**ISBN: 978-84-692-2299-7**

**Dipòsit legal: GI. 376-2009**

<http://hdl.handle.net/10803/8051>

**ADVERTIMENT.** La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei [TDX](#) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

**ADVERTENCIA.** La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio [TDR](#) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

**WARNING.** On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the [TDX](#) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Departament de Química

Àrea de Química Analítica

**Tesi Doctoral**

**ESTUDI DE LA MOBILITAT I BIODISPONIBILITAT DE  
POL·LUENTS EN LA ZONA MINERA DEL CAMP DE  
CARTAGENA**

Memòria presentada per **Marta  
Sánchez i Bassols** per optar al  
grau de Doctora per la  
Universitat de Girona

Girona, 2008





Departament de Química

Àrea de Química Analítica

**Manuela Hidalgo Muñoz**, Professora Titular de Química Analítica de la Universitat de Girona,

CERTIFICA:

Que els estudis recollits en aquesta memòria sota el títol **“Estudi de la mobilitat i biodisponibilitat de pol·luents en la zona minera del Camp de Cartagena”**, han estat realitzats sota la meva direcció per **Marta Sánchez i Bassols**, llicenciada en Química, per optar al grau de Doctora per la Universitat de Girona.

I perquè així consti, signo la present certificació.

Girona, 23 d'octubre del 2008

Dra. Manuela Hidalgo Muñoz



Els estudis que es recullen en aquesta memòria s'han desenvolupat en el marc dels projectes d'investigació:

- Estudio integrado de la calidad del agua en zonas de abandono minero. Evaluación de los efectos sobre el medio hídrico superficial y subterráneo y de las posibles acciones para su atenuación (CGL2004-05963-C04-03/HID)
- Procesos de transferencia de metales pesados al medio hídrico desde antiguas zonas de minería Pb-Zn en el ámbito mediterráneo. (PPQ2001-2100-C04-04)

Marta Sánchez i Bassols ha gaudit d'una beca predoctoral per a la formació del personal investigador de l'antic Ministerio de Ciencia y Tecnología (BES-2003-2659).



*A la meva família*





<b>Resum .....</b>	<b>1</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>5</b>
<b>Summary .....</b>	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>13</b>
<b>I.1. ZONA D'ESTUDI .....</b>	<b>16</b>
I.1.1. Situació geogràfica .....	16
I.1.2. Activitat minera .....	20
<b>I.2. EL PROBLEMA AMBIENTAL DELS RESIDUS MINERS ABANDONATS....</b>	<b>27</b>
<b>I.3. AVALUACIÓ DE LA CONTAMINACIÓ PER METALLS I EL SEU EFECTE</b>	<b>28</b>
I.3.1. Extraccions simples .....	29
I.3.2. Esquemes d'extracció seqüencial .....	31
I.3.3. Els sulfurs volàtils (AVS) .....	32
<b>I.4. ÚS D'ORGANISMES COM A BIOMONITORS DE LA CONTAMINACIÓ ....</b>	<b>36</b>
<b>I.5. ÚS DE LA TÈCNICA 'DIFFUSIVE GRADIENTS IN THIN FILMS' (DGT) PER</b>	
<b>AVALUAR LA BIODISPONIBILITAT DELS METALLS .....</b>	<b>42</b>
<b>I.6. CONTAMINACIÓ PER COMPOSTOS ORGANOESTÀNNICS .....</b>	<b>44</b>
<b>I.7. REFERÈNCIES .....</b>	<b>49</b>
<b>OBJECTIUS .....</b>	<b>57</b>
<b>CAPÍTOL 1</b>	
<b>CARACTERITZACIÓ DE LA CONTAMINACIÓ PER METALLS EN ELS</b>	
<b>SEDIMENTS DEL MAR MENOR .....</b>	<b>61</b>
<b>1.1. INTRODUCCIÓ .....</b>	<b>63</b>
<b>1.2. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>68</b>

1.2.1. Equips i reactius .....	68
1.2.2. Procediment experimental.....	69
1.2.2.1. Presa de mostres .....	69
1.2.2.2. Esquemes d'extracció seqüencial.....	70
1.2.2.3. Determinació dels sulfurs volàtils.....	73
<b>1.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....</b>	<b>75</b>
1.3.1. Esquemes d'extracció seqüencial.....	77
1.3.2. Determinació dels sulfurs volàtils .....	85
<b>1.4. CONCLUSIONS.....</b>	<b>89</b>
<b>1.5. REFERÈNCIES .....</b>	<b>90</b>

## CAPÍTOL 2

### CARACTERITZACIÓ DELS RESIDUS DE MINERIA I RELACIONS AMB LA CONTAMINACIÓ PER METALLS EN ELS SEDIMENTS DEL MAR MENOR ...93

<b>2.1. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>95</b>
<b>2.2. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>99</b>
2.2.1. Equips i reactius .....	99
2.2.2. Procediment experimental.....	99
2.2.2.1. Presa de mostres .....	99
2.2.2.2. Extraccions simples i seqüencials .....	101
2.2.2.3. Anàlisi estadística .....	101
2.2.2.3.1. Anàlisi per components principals en dues dimensions .....	101
2.2.2.3.2. Anàlisi per components principals en tres dimensions: PARAFAC.....	102
<b>2.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....</b>	<b>103</b>
2.3.1. Avaluació del risc de diferents tipus de residus .....	103
2.3.1.1. Tests de lixiviació.....	103
2.3.1.2. Fraccionament dels metalls .....	105
2.3.2. Interpretació del fraccionament de metalls en residus i sediments mitjançant tècniques d'anàlisi multivariant .....	107
2.3.3. Tractament estadístic de les dades .....	108
2.3.3.1. Anàlisi per components principals de la primera etapa del BCR.....	108
2.3.3.2. Anàlisi per components principals de la segona etapa del BCR.....	110

2.3.3.3. Anàlisi per components principals de la tercera etapa del BCR .....	112
2.3.3.4. Anàlisi per components principals de l'etapa residual del BCR.....	114
2.3.3.5. Anàlisi per components principals en dues dimensions de la matriu desdoblada.....	116
2.3.3.6. Anàlisi per components principals en tres dimensions: PARAFAC.....	125
<b>2.4. CONCLUSIONS.....</b>	<b>128</b>
<b>2.5. REFERÈNCIES.....</b>	<b>129</b>

### **CAPÍTOL 3**

<b>AVALUACIÓ DE LA BIODISPONIBILITAT DELS METALLS PRESENTS EN ELS SEDIMENTS DEL MAR MENOR.....</b>	<b>131</b>
<b>3.1. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>133</b>
<b>3.2. EXPERIMENTAL .....</b>	<b>140</b>
3.2.1. Equips i reactius .....	140
3.2.2. Procediment experimental .....	141
3.2.2.1. Presa de mostres.....	141
3.2.2.2. Estudi de l'acumulació de metalls en biofilm.....	142
3.2.2.3. Acumulació de metalls en algues verdes .....	144
3.2.2.4. Determinació de l'acumulació de metalls en peixos i bivalves.....	145
3.2.2.5. Determinació de metalls mitjançant la tècnica DGT .....	145
<b>3.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....</b>	<b>147</b>
3.3.1. Estudi de l'acumulació de metalls en biofilm .....	147
3.3.2. Acumulació de metalls en algues verdes .....	150
3.3.3. Determinació de l'acumulació de metalls en peixos i bivalves.....	152
3.3.4. Determinació de la concentració de metalls en l'aigua del mar Menor .....	153
3.3.5. Relacions amb les característiques del sediment.....	157
<b>3.4. CONCLUSIONS.....</b>	<b>160</b>
<b>3.5. REFERÈNCIES.....</b>	<b>161</b>

## **CAPÍTOL 4**

### **DETERMINACIÓ DE COMPOSTOS ORGANOESTÀNNICS EN ORGANISMES DEL MAR MENOR.....165**

#### **4.1. INTRODUCCIÓ.....167**

#### **4.2. EXPERIMENTAL .....174**

4.2.1. Equips i reactius .....174

4.2.2. Procediment experimental.....175

4.2.2.1. *Presa de mostres* .....175

4.2.2.2. *Derivatització dels compostos organoestànics* .....175

4.2.2.3. *Condicions cromatogràfiques* .....176

4.2.2.4. *Anàlisi per dilució isotòpica mitjançant GC-MS*.....176

4.2.2.5. *Extracció dels compostos organoestànics de mostres i materials de referència* .....177

#### **4.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ .....178**

4.3.1. Determinació dels compostos organoestànics.....178

4.3.2. Derivatització dels compostos organoestànics.....179

4.3.3. Optimització de l'etapa d'extracció per a organismes marins .....180

4.3.4. Avaluació del mètode.....182

4.3.5. Anàlisi de mostres de peixos i bivalves .....183

#### **4.4. CONCLUSIONS.....186**

#### **4.5. REFERÈNCIES .....187**

### **CONCLUSIONS.....191**

### **AGRAÏMENTS .....197**



## RESUM

Gran part del districte miner Cartagena-La Unión es troba ocupat per residus provinents d'activitats mineres actualment abandonades. Aquestes activitats, desenvolupades històricament en les muntanyes situades en la costa sud de la llacuna costanera del mar Menor, han provocat la contaminació per metalls dels sediments d'aquesta llacuna.

La investigació que es presenta en aquesta tesi es centra en l'avaluació de la contaminació i disponibilitat metàl·lica deguda a diferents activitats antropogèniques dutes a terme en l'entorn del mar Menor. Amb aquest objectiu s'han investigat diferents matrius ambientals en la zona d'estudi.

En primer lloc, es van aplicar procediments d'extracció seqüencial sobre els sediments de la cubeta sud del mar Menor per tal d'estudiar la contaminació metàl·lica present i avaluar les formes en les que aquests metalls es troben enllaçats al sediment. Els resultats de la determinació dels metalls en el sediment va mostrar l'elevada contaminació metàl·lica present a la zona, sobretot quan estudiem la fracció fina del sediment (amb continguts de fins  $8.000 \text{ mg kg}^{-1}$  en el cas de Pb i Zn), tot i que les concentracions de metalls presents a l'aigua de mar són molt baixes. Les concentracions de metalls en el sediment són més elevades en les mostres provinents de la desembocadura de les rambles que drenen la zona minera i que, per tant, aporten residus de mineria cap al mar Menor. L'aplicació de diferents esquemes d'extracció seqüencial sobre els sediments ha permès obtenir informacions complementàries sobre la potencial mobilitat dels metalls.

L'estudi del fraccionament dels metalls en el sediment va mostrar que els principals metalls extrets en les mines de la regió, Pb i Zn, es troben associats amb la fracció d'òxids de ferro i manganès mentre que el Cd, metall trobat com a impuresa en les menes de mineral i que, per tant, es troba en concentracions molt inferiors, s'associa a la fracció més mòbil i disponible. Altres metalls com Cu, Ni i As es troben enllaçats a l'estructura mineral del sediment i, per tant, no es consideren mòbils.

Per altra part, s'han caracteritzat els residus presents a la Sierra de Cartagena, origen de la contaminació, per tal d'investigar relacions entre aquests i els sediments de les rambles i del mar Menor. En aquest sentit, s'han classificat els residus presents a la Sierra segons l'etapa de tractament de la qual provenen i s'han analitzat mostres dels diferents residus mitjançant el test de lixiviació DIN 38414-S4, utilitzat pel Consell Regulador dels Residus de Catalunya com a criteri d'acceptació per a la disposició d'un residu en un abocador. Els resultats de l'aplicació d'aquest test mostren que en tots els residus les concentracions extretes de Cu i Ni són inferiors als nivells màxims permesos, per tant, aquests metalls no serien problemàtics en aquests residus. En canvi, les concentracions extretes de Pb, Zn i Cd, superen en alguns casos aquests nivells màxims permesos pel que s'haurien de considerar residus perillosos. S'han comparat els resultats del test de lixiviació amb els resultats de l'aplicació del procediment d'extracció seqüencial BCR i es mostren diferències en quant a la mobilitat dels metalls segons els dos procediments degut a que l'extracció en el test de lixiviació ve dominada pel pH del residu i en el cas de l'esquema BCR no és així.

Amb la finalitat d'aprofundir més en aquest estudi, s'ha aplicat el procediment d'extracció seqüencial BCR a mostres de residus i sediments provinents de les diferents rambles estudiades. L'avaluació dels resultats obtinguts s'ha realitzat mitjançant eines quimiomètriques que ens permeten analitzar gran quantitat de dades de manera gràfica permetent l'aprofundiment en l'estructura d'aquestes. Particularment, s'ha realitzat l'anàlisi per components principals en dues dimensions que ens permet obtenir agrupacions entre els metalls i obtenir certs valors extrems, però no evidencia una agrupació clara de les mostres ni relacions entre elles. Per aquest motiu s'ha optat per a l'aplicació del model PARAFAC en tres dimensions que ens permet diferenciar, per una banda, les mostres provinents de la conca de la rambla de Beal i, per l'altra, les mostres corresponents a residus (amb una concentració de metalls més elevada) de les corresponents a sediments.

Per a l'estudi de la biodisponibilitat s'han utilitzat organismes biomonitors com algues verdes i biofilm per a avaluar l'acumulació de metalls en aquests. En el cas dels biofilms, s'ha portat a terme el desenvolupament d'aquests en diferents punts del mar Menor durant un mes i mig i, posteriorment, s'ha determinat el contingut de metall acumulat. En canvi, les algues verdes s'han recollit en punts lliures de contaminació i s'han

exposat a aigua i sediment del mar Menor en el laboratori durant una setmana. Els resultats de l'anàlisi dels metalls acumulats en els organismes ha demostrat que el fet que aquests es vegin exposats al sediment de les rambles que drenen la Sierra de Cartagena fa que augmenti la concentració de metall acumulat, particularment quan es tracta de sediment provinent de la rambla de Beal. Aquests resultats es poden relacionar amb els resultats obtinguts en l'aplicació de l'esquema d'extracció seqüencial BCR sobre la fracció fina del sediment, concretament amb el metall extret en la primera etapa que és el que s'indica com a més mòbil i biodisponible.

Seguint aquest mateix criteri, s'ha avaluat la tècnica '*diffusive gradients in thin films*' (DGT) per a determinar la concentració de metalls en l'aigua del mar Menor. Tot i que les concentracions de metalls en l'aigua són molt baixes, aquestes augmenten quan ens situem en punts propers a la desembocadura de les rambles que drenen la Sierra de Cartagena sobretot quan ens trobem amb episodis de recàrrega i resuspensió de sediments. Els resultats de l'aplicació de la tècnica DGT es poden relacionar amb els resultats obtinguts en la determinació de l'acumulació de metalls per organismes, mostrant-la com una bona alternativa a l'ús d'espècies biomonitores de la contaminació.

També s'ha determinat el contingut de metall en peixos i escopinyes per a posar de manifest possibles efectes de biomagnificació. En aquest sentit, en les mostres analitzades s'han trobat concentracions per sobre del nivell màxim permès per les normatives de la Comunitat Europea i per la Organització d'Alimentació i Agricultura. No obstant això, caldria realitzar un estudi en profunditat per a establir la seguretat d'aquests productes per al consum humà.

Finalment, s'ha considerat interessant avaluar altres contaminacions antropogèniques, amb origen diferent al de la mineria, que poden estar presents en el mar Menor. En aquest sentit, s'ha estudiat l'especiació de l'estany en peixos i escopinyes provinents del mar Menor. L'estany té un gran nombre de compostos organometàl·lics amb una gran aplicació, concretament el tributilestany ha estat àmpliament utilitzat en pintures antiincrustacions per als vaixells i, tot i que actualment el seu ús està prohibit, al trobar-nos en un mar tancat i amb unes característiques tan especials s'ha considerat interessant avaluar la concentració en els organismes. En aquest sentit, s'ha desenvolupat un mètode per a la determinació simultània de tributilestany i els seus metabòlits utilitzant una sonda



d'ultrasons i l'anàlisi per dilució isotòpica el que permet reduir en gran mesura el temps i la complexitat de l'anàlisi en mostres reals. La validació d'aquest mètode s'ha realitzat mitjançant l'anàlisi de materials de referència certificats i de mostres fortificades a diferents nivells de concentració. La concentració trobada en els organismes s'ha comparat amb altres estudis realitzats en diferents llocs arreu del món i s'observa que les concentracions trobades en aquest estudi són comparables a les reportades en altres estudis consultats. En general, la concentració de tributilestany és superior a la dels seus metabòlits el que indica que aquesta espècie encara és introduïda en el medi. Les concentracions trobades en peixos són molt inferiors a les trobades en les escopinyes, tal com vèiem en el cas dels metalls, degut a que aquestes són organismes filtradors i que poden assimilar els metalls directament del sediment.



## RESUMEN

Gran parte del distrito minero Cartagena-La Unión se encuentra ocupado por residuos provenientes de actividades mineras abandonadas en la actualidad. Estas actividades, desarrolladas históricamente en las montañas situadas en la cubeta sur de la laguna costera del mar Menor, han provocado la contaminación por metales de los sedimentos de esta laguna.

La investigación que se presenta en esta tesis se centra en la evaluación de la contaminación y disponibilidad metálica debida a diferentes actividades antropogénicas llevadas en el entorno del mar Menor. Con este objetivo se han investigado diferentes matrices ambientales en la zona de estudio.

En primer lugar, se han aplicado procedimientos de extracción secuencial a muestras de sedimentos de la cubeta sur del mar Menor con la finalidad de estudiar la contaminación metálica presente y evaluar las formas en las que estos metales se encuentran unidos al sedimento. Los resultados de la determinación de los metales en el sedimento mostraron la elevada contaminación metálica presente en la zona especialmente cuando se trata de la fracción fina del sedimento (con contenidos que alcanzan  $8000 \text{ mg Kg}^{-1}$  en el caso de Pb y Zn), aun cuando las concentraciones de metales presentes en el agua de mar son muy bajas. Las concentraciones de metales en el sedimento son más elevadas en las muestras procedentes de la desembocadura de las ramblas que drenan la zona minera y que, por lo tanto, aportan residuos de minería hacia el mar Menor. La aplicación de diferentes esquemas de extracción secuencial a los sedimentos ha permitido obtener informaciones complementarias sobre la potencial movilidad de los metales.

El estudio del fraccionamiento de los metales en el sedimento mostró que los principales metales extraídos en las minas de la región, Pb y Zn, se encuentran asociados con la fracción de óxidos de hierro y manganeso mientras que el Cd, metal encontrado como impureza en las menas de mineral y que, por lo tanto, se encuentra en concentraciones muy inferiores, se asocia a la fracción más móvil y disponible. Otros

metales como Cu, Ni y As se encuentran enlazados a la estructura mineral del sedimento, por lo que no se consideran móviles.

Por otra parte, se han caracterizado los residuos presentes en la Sierra de Cartagena, origen de la contaminación, con el objetivo de investigar relaciones entre éstos y los sedimentos de las ramblas y del mar Menor. En este sentido, se han clasificado los residuos presentes en la Sierra según la etapa de tratamiento de la que provienen, y se han analizado muestras de los diferentes residuos mediante el test de lixiviación DIN 38414-S4, que utiliza el ‘Consell Regulador dels Residus de Catalunya’ como criterio de aceptación para el depósito de un residuo en un vertedero. Los resultados de la aplicación de este test muestran que en todos los residuos las concentraciones extraídas de Cu y Ni son inferiores a los niveles máximos permitidos, por lo tanto, estos metales no son problemáticos en estos residuos. En cambio, las concentraciones extraídas de Pb, Zn y Cd, superan en algunos casos estos niveles máximos permitidos por lo que nos encontramos con algunos residuos peligrosos. Se han comparado los resultados del test de lixiviación con los resultados de la aplicación del procedimiento de extracción secuencial BCR y se muestran diferencias en cuanto a la movilidad de los metales según los dos procedimientos debido a que la extracción en el test de lixiviación viene dominada por el pH del residuo mientras que en el caso del esquema BCR no es así.

Con la finalidad de profundizar más en este estudio, se ha aplicado el procedimiento de extracción secuencial BCR a muestras de residuos y sedimentos provenientes de las diferentes ramblas estudiadas. La evaluación de los resultados obtenidos se ha realizado mediante herramientas quimiométricas que nos permiten analizar gran cantidad de datos de manera gráfica permitiendo la profundización en la estructura de los mismos. Particularmente, se ha realizado el análisis por componentes principales en dos dimensiones que nos permite obtener agrupaciones entre los metales y obtener ciertos valores extremos, pero no evidencia una agrupación clara de las muestras ni relaciones entre ellas. Por este motivo se ha optado por la aplicación del modelo PARAFAC en tres dimensiones que nos permite diferenciar, de una parte, las muestras provenientes de la cuenca de la rambla de Beal y, por la otra, diferenciamos entre las muestras correspondientes a residuos (con una concentración de metales más elevada) de las correspondientes a sedimentos.

Para el estudio de la biodisponibilidad se han utilizado organismos biomonitores como algas verdes y biofilms para evaluar la acumulación de metales en éstos. En el caso de los biofilms, éstos se han desarrollado en diferentes puntos del mar Menor durante un mes y medio y posteriormente se ha determinado el contenido de metal acumulado. En cambio, las algas verdes se han recogido en puntos libres de contaminación y se han expuesto a agua y sedimento del mar Menor en el laboratorio durante una semana. Los resultados del análisis de los metales acumulados en los organismos ha demostrado que el hecho que estos se vean expuestos al sedimento de las ramblas que drenan la Sierra de Cartagena hace que aumente la concentración de metal acumulado, particularmente cuando se trata de sedimento proveniente de la rambla de Beal. Estos resultados se pueden relacionar con los resultados obtenidos en la aplicación del esquema de extracción secuencial BCR sobre la fracción fina del sedimento, concretamente con el metal extraído en la primera etapa que es el que se indica como más móvil y biodisponible.

Siguiendo este mismo criterio, se ha evaluado la técnica '*diffusive gradients in thin films*' (DGT) para determinar la concentración de metales en el agua del mar Menor. Aún cuando las concentraciones de metales en el agua son muy bajas, estas aumentan cuando nos situamos en puntos próximos a la desembocadura de las ramblas que drenan la Sierra de Cartagena sobre todo cuando nos encontramos con episodios de recarga y resuspensión de sedimentos. Los resultados de la aplicación de la técnica DGT se pueden relacionar con los resultados obtenidos en la determinación de la acumulación de metales por organismos, mostrándola como una buena alternativa al uso de especies biomonitonas de la contaminación.

También se ha analizado el contenido de metal en peces y bivalvos para poner de manifiesto posibles efectos de biomagnificación. En este sentido, se han hallado concentraciones por encima del nivel máximo permitido por las normativas de la Comunidad Europea y por la Organización de Alimentación y Agricultura. No obstante, sería necesario realizar un estudio en profundidad para establecer la seguridad de estos productos para el consumo humano.

Por último, se ha considerado interesante evaluar otras contaminaciones antropogénicas, con origen diferente a la minería, que pueden estar presentes en el mar Menor. En este sentido, se ha estudiado la especiación del estaño en peces y bivalvos

provenientes del mar Menor. El estaño tiene un gran número de compuestos organometálicos con una gran aplicación, concretamente el tributilestaño ha sido ampliamente utilizado en pinturas antiincrustaciones para los barcos y, aun cuando actualmente su uso está prohibido, al encontrarnos en un mar cerrado y con unas características tan especiales se ha considerado interesante evaluar la concentración en los organismos. En este sentido, se ha desarrollado un método para la determinación simultánea de tributilestaño y sus metabolitos utilizando una sonda de ultrasonidos y el análisis por dilución isotópica lo que permite reducir en gran medida el tiempo y la complejidad del análisis en muestras reales. La validación de este método se ha realizado mediante el análisis de materiales de referencia certificados y de muestras fortificadas a diferentes niveles de concentración. Las concentraciones encontradas en los organismos estudiados se han comparado con otros estudios realizados en diferentes lugares del mundo y se observa que las concentraciones encontradas en este estudio son comparables a las reportadas en otros estudios consultados. En general, la concentración de tributilestaño es superior a la de sus metabolitos lo que indica que esta especie todavía es introducida en el medio. Las concentraciones encontradas en peces son muy inferiores a las que se encuentran en los bivalvos, tal y como veíamos en el caso de los metales, debido a que estos son organismos filtradores y pueden asimilar los metales directamente del sedimento.



As a result of past mining activities, extensive amounts of wastes are present in the mining district Cartagena-La Unión (Murcia, South-East Spain). These activities, developed historically in the mountains in the south basin of the coastal lagoon of the Mar Menor, have caused the metal pollution of the marine sediments. The research presented in this thesis is focused on the evaluation of the metal pollution and potential availability due to different human activities around the Mar Menor. With this aim different environmental matrices were investigated in the area of study.

The results of analytical determinations in the sediments from the south basin of the Mar Menor showed high metal levels especially in the fine fraction of the sediment (up to 8000 mg Kg<sup>-1</sup> in the case of Pb and Zn), although determined metal concentrations in the seawater were low. The highest metal contents were found in the sediment samples from the mouths of desert streams that drain the mining zone and that, therefore, transport mining wastes towards the Mar Menor. Furthermore, different sequential fractionation schemes, operationally defined speciation procedures, were applied on the marine sediments to evaluate the availability and mobility of the metals present and the forms in which these metals are bound to the sediment.

The results of the fractionation studies indicated that the main metals extracted in the mines of the region, Pb and Zn, are associated with the fraction of iron and manganese oxides whereas Cd, metal found as impurity in the ores and, hence present at low concentrations, is associated to the most mobile and available fraction. Metals such as Cu, Ni and As, are connected to the mineral lattice of the sediment, and therefore their potential mobility could be considered to be low.

On the other hand, mining wastes from the Sierra de Cartagena, the source of the pollution, were also characterized and relationships between wastes and sediments investigated. In this regard, the wastes were classified according to their origin and samples from different types of wastes were submitted to the leaching test DIN 38414-S4

this is proposed by the environment agency of Catalonia as criterion of acceptance for a waste to be disposed of. The results of the application of this test showed that Cu and Ni concentrations in the extracts were in all cases below the maximum allowed levels. On the contrary, the concentrations of Pb, Zn and Cd exceeded in some cases these maximum levels allowed, and therefore some wastes have to be considered as potentially hazardous material. These results were compared with the results obtained from the application of the sequential extraction procedure proposed by the BCR and differences concerning predicted metal mobility were observed, mainly because the extraction in the leaching test is dominated by the pH of the waste, whereas this is not the case for the BCR extraction scheme.

Data obtained from the application of the BCR fractionation procedure to marine sediments, wastes and sediments from desert streams of the area of study were analyzed by means of multivariate techniques. Although classical two-way Principal Component Analysis allowed identifying metal associations and some singular values, neither clear associations of the samples nor relationships between them were found. The application of three-way PCA procedures such as PARAFAC showed a distinct group that comprises samples from the basin of Beal's desert stream.

Regarding the bioavailability studies, green algae and biofilm were used as biomonitors for evaluating the metal accumulation in marine organisms. In the case of biofilms they were developed in different locations of the Mar Menor for one month and a half and subsequently, the total and intracellular accumulated metal content were determined. On the other hand, specimens of the green algae *Ulva lactuca* were sampled in non-polluted locations of the Girona coast (North-East Spain) and were exposed to water and sediment from the Mar Menor in the laboratory for one week. The results of the analysis of the accumulated metals in the organisms demonstrated that the exposition to the sediment of the desert streams that are draining the Sierra de Cartagena leads to an increase of the accumulated metal concentration, more important in the case of sediment from Beal's desert stream. These observations can be related to the results obtained in the application of the sequential extraction scheme BCR on the fine fraction of the sediments, more specifically to the metal extracted in the first step, associated to the more mobile and bioavailable fraction.

The diffusive gradients in thin films technique (DGT) was also evaluated for the determination of metal concentrations in seawater of the Mar Menor in field and laboratory experiments. The highest measured concentrations were found in the vicinity of the mouths of the desert streams that drain the Sierra de Cartagena, particularly when episodes of recharge or resuspension of sediments took place. Furthermore, the results of the application of the DGT technology can be related with the results obtained in the determination of the metal accumulated by organisms, showing it as a good alternative to the use of biomonitors.

In addition, metal concentrations in fishes and bivalves from the Mar Menor were determined to evaluate possible biomagnification's effects. In this regard, some values over the maximum level allowed by the regulations of the European Community were found. However, more exhaustive studies should be performed to get conclusive assumptions on the safety of these products for human consumption.

Finally, other type of metal pollution, not originated from mining activities, has been also considered. In this sense, tin speciation has been investigated in fishes and bivalves from the Mar Menor. Tin forms a large number of organometallic compounds with a great variety of applications and therefore are widespread in the environment. Particularly, tributyltin (TBT) has been continually employed over the last 30 years as an additive in paints designed to protect ships against biological fouling. In this work, a simple methodology for the simultaneous determination of tributyltin and its main metabolites dibutyltin (DBT) and monobutyltin (MBT) was developed. The method is based on the use of an ultrasonic probe for the extraction of butyltins from the sample followed by sodium tetraethylborate derivatization, both allowing the reduction of handling time to minutes. Isotope dilution analysis is used for the quantitation of butyltin species in the extract by  $^{119}\text{Sn}$  enriched species and GC-MS. The accuracy of the proposed method was evaluated on spiked real samples and on two reference materials, NIES-11 and CRM477, fish and mussel tissue respectively. The developed method was applied to the analysis of different seafood samples, fish and bivalves, from the Mar Menor obtaining concentrations in the range of 8.4-1000 ng Sn g<sup>-1</sup>, 4.7-550 ng Sn g<sup>-1</sup> and 3.5-540 ng Sn g<sup>-1</sup> for TBT, DBT and MBT, respectively. TBT was present in most samples at higher concentrations than its metabolites, in agreement with data found in the literature. Butyltin



levels in fishes were lower than in bivalves, as was also observed in the case of the other metals studied, due to the fact that these are filtering organisms and they can assimilate metals directly from the sediment.



# INTRODUCCIÓ



Qualsevol activitat humana provoca que entrin en el medi tipus indesitjables de matèria. Malgrat tot, mentre la quantitat d'aquestes substàncies no superi la capacitat del medi per transformar-les i els seus efectes no siguin adversos o estiguin restringits en el temps i l'espai, es pot considerar que hi ha una contaminació temporal o parcial que, tot i que requereix atenció, pot evitar-se o eliminar-se. Els problemes greus apareixen quan la contaminació s'estén en el temps i l'espai, és a dir, quan el nombre i classe dels sistemes o substrats contaminats augmenten i romanen així per períodes prolongats. Es trenca d'aquesta manera l'equilibri ecològic i s'observen, de manera aïllada o simultània, efectes adversos que poden ser acumulatius, de llindar o d'interacció [I.1].

Aquesta tesi s'ha centrat, principalment, en l'estudi de la contaminació per metalls, ja que la seva persistència en l'ambient ocasiona una problemàtica especial. A diferència dels contaminants orgànics, els metalls no poden degradar-se ni biològicament ni químicament en la natura. Els compostos que contenen metalls poden alterar-se, però els elements metàl·lics indesitjables romanen en el medi, i en alguns casos aquestes alteracions porten a espècies que contenen el metall i són més tòxiques que les inicials [I.2]. A la **taula I.1** podem observar l'efecte d'alguns elements sobre els organismes, així com els valors límit en aigües potables establerts per la legislació europea.

**Taula I.1.** Límits de tolerància en la legislació europea en aigües potables ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) i efectes d'alguns metalls.

Element	Límit	Efectes tòxics
Cd	5	Afeccions renals, cardiovasculars. Hipertensió. Reemplaça bioquímicament el Zn.
Cu	2.000	Tòxic en algues i plantes. No gaire tòxic en animals, sistema digestiu.
Ni	20	Cancerigen a dosis altes, dermatitis, nàusees.
Pb	10	Molt tòxic en nens i dones embarassades. Danys al sistema nerviós, ronyó. Anèmia.
Zn	5.000	Fitotòxic a altes concentracions.

En aquest treball s'han estudiat metodologies per avaluar l'impacte de la contaminació en la zona del mar Menor i la Sierra de Cartagena. Aquesta és una àrea afectada per diverses activitats antropogèniques com són la mineria, la pesca, l'explotació agrícola, el turisme, etc. Per tant, s'ha estudiat, per una banda, la contaminació per metalls que es deriva de l'activitat minera, principal font de contaminació, desenvolupada durant segles a la zona d'estudi. Els metalls que s'extreien en aquesta zona eren Pb i Zn principalment. Per altra banda, s'ha investigat la presència de compostos organoestànics originats per altres activitats com la pesca i el turisme. L'avaluació de l'impacte de la contaminació implica l'estudi en diferents

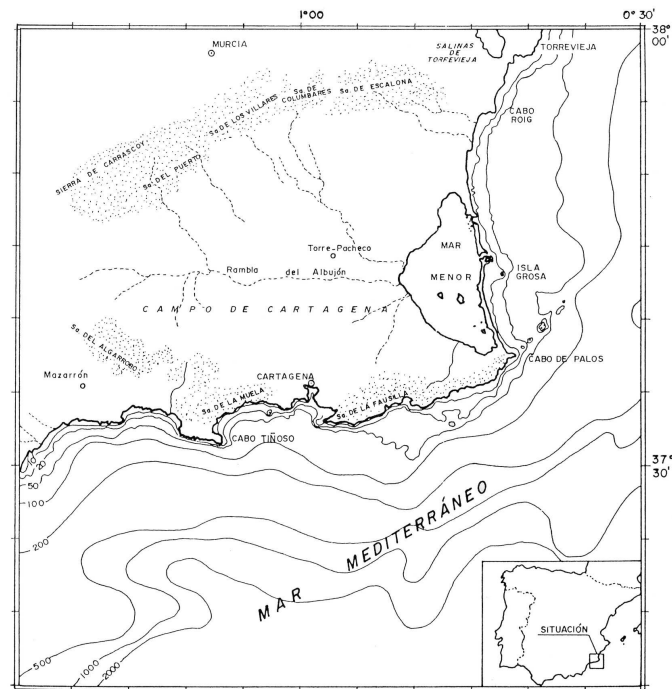
matrius ambientals, com són els sediments, l'aigua i els organismes que viuen a la zona afectada per la contaminació.

### I.1. ZONA D'ESTUDI

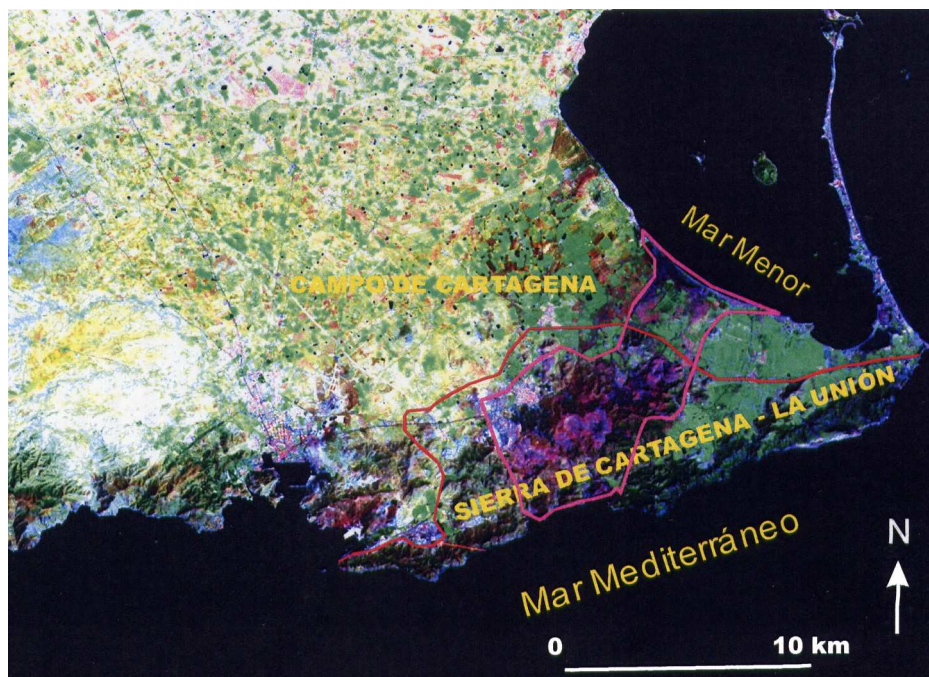
#### I.1.1. Situació geogràfica

La Sierra de Cartagena constitueix l'extrem sud-oriental de les serralades Bètiques; es troba al sud-est d'Espanya, concretament a la província de Múrcia, com es pot veure a les **figures I.1-I.2**. Els seus relleus, que no superen els 450 m, s'estenen en direcció est-oest aproximadament, entre la plana del mar Menor i el Mediterrani i es troba limitada en la part septentrional per l'anomenat Campo de Cartagena. La zona minera pròpiament dita, centrada en el terme municipal de la Unión, ocupa una superfície rectangular, allargada en direcció nord-est sud-oest, d'uns  $10 \times 5$  km, que comprèn una de les principals acumulacions de Pb-Zn de la península Ibèrica. L'activitat minera en la zona data de més de 2.500 anys i va arribar a la seva esplendor durant l'època romana. Després del seu abandonament secular, es dona un ressorgiment en la segona meitat del segle XIX, fins al punt que aquest districte arriba a trobar-se, a finals de segle, entre els primers productors de plom mundials. Al segle XX, després del parèntesi d'entreguerres, es dona una tercera època d'esplendor, amb el desenvolupament de les tècniques metal·lúrgiques i de mineria a cel obert, que arriba fins al 1991, data de cessament de l'activitat [I.3].

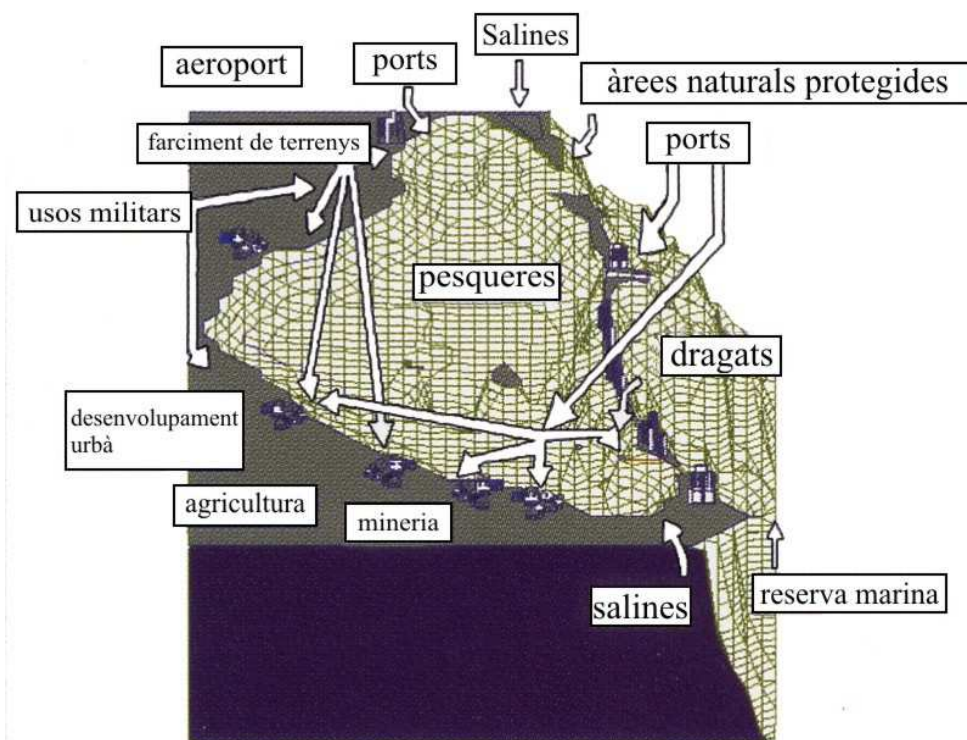
El mar Menor és una de les llacunes costaneres més grans d'Europa i el Mediterrani. La seva conca i la mateixa llacuna constitueixen un dels recursos naturals més versàtils, variats, productius i emblemàtics de la regió. A causa de les seves característiques, manté múltiples usos i activitats, que coexisteixen en un espai reduït i competeixen pels recursos presents (**figura I.3**). Aquesta llacuna hipersalina és relativament poc profunda (de 5 a 8 m) i ocupa una superfície aproximada de  $130 \text{ km}^2$ . Es troba comunicada amb el mar Mediterrani per cinc canals al llarg de la Manga (estret cordó litoral sorrenc de 24 km de llarg i entre 100 i 800 m d'ample que la separa del Mediterrani), i d'aquesta manera es regula la circulació d'aigua amb el mar Mediterrani.



**Figura I.1.** Situació de la zona d'estudi [I.4].



**Figura I.2.** Fotografia per satèl·lit de l'àrea compresa per la Sierra de Cartagena - La Unión. En la imatge ressalta en color morat la superfície ocupada per la Sierra Minera i l'àrea afectada per la deposició de sediments rics en metalls en les rambls del Beal, Ponce i Carrasquilla, per la banda del mar Menor, i la rambla del Gorguel, per la banda del Mediterrani [I.5].

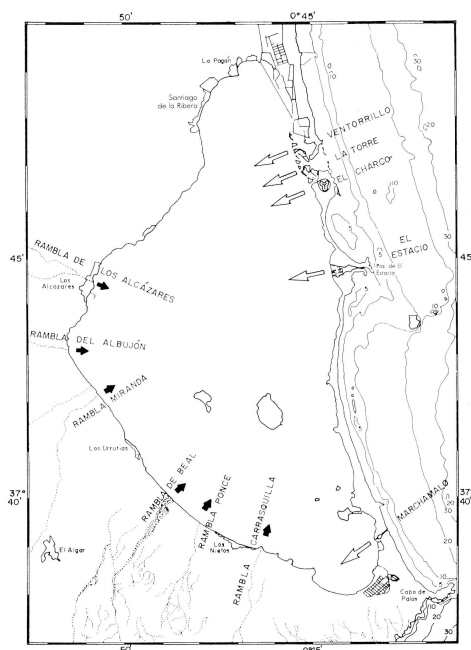


**Figura I.3.** Activitats que coexisteixen al mar Menor [I.6].

L'alimentació d'aigua continental es realitza fonamentalment a través de sis rambles (corrents d'aigua superficial de règim no continu o intermitent), com es mostra a la **figura I.4**. A causa de la configuració orogràfica de l'entorn i del clima mediterrani subàrid de la zona, la xarxa de drenatge es presenta amb un marcat caràcter torrencial, de manera que l'aportament d'aigües continentals resulta molt irregular i fins i tot amb un drenatge difós segons la zona. Les precipitacions solen concentrar-se en pocs dies l'any, principalment a la primavera i la tardor, i en la majoria dels casos són de caràcter torrencial. L'existència d'un sistema muntanyós (Sierra de Cartagena) situat en les proximitats de la costa meridional de la llacuna força la canalització i major desenvolupament de la xarxa de drenatge, per la qual cosa aquesta xarxa resulta ser més densa a la meitat sud del mar Menor que en la nord. Les principals rambles que desemboquen en la llacuna són les següents:

- Rambla de Los Alcázares, amb una xarxa difosa però que es pot seguir des del vessant meridional de la serra d'Escalona.
- Rambla d'El Albujión, la més extensa, ja que travessa pràcticament tota la plana prelitoral al mar Menor.

- Rambla Miranda, que desemboca al nord d'El Carmolí i s'estima que té una longitud propera als 8 km.
- Rambla d'El Beal: és la més important de les existents en el vessant meridional, ja que canalitza les aigües procedents de la zona d'El Llano i dels monts de San Ginés. Presenta un con de dejecció molt ampli, per la qual cosa no només es porten sediments en medi hídric, sinó que, en els moments de forta intensitat eòlica, es transporta un gran volum de materials fins, inclosos en la massa d'aire, que es dipositen posteriorment a l'interior del mar Menor.
- Rambla de Ponce, de menor recorregut però de notable importància pels aportaments que canalitza procedents de Los Blancos.
- Rambla de Carrasquilla, que desemboca entre Los Nietos i la punta de Las Lomas i que imprimeix al litoral una suau morfologia de prisma al·luvial de tipus delta.



**Figura I.4.** Entrades d'aigua al mar Menor [I.4].

Les ramblas que drenen tota la conca tributen al mar Menor una quantitat d'aigua no gaire abundant, acompanyada d'un important volum de sediments. Aquests cursos són molt variables i discontinus i romanen secs la major part de l'any. A causa de la poca entrada d'aigua dolça i l'elevat nivell d'evaporació, el mar Menor presenta salinitats molt elevades (42-47 ‰) [I.4, I.6, I.7].



Durant segles, els homes han habitat i explotat el mar Menor sense incidir de manera significativa en la seva evolució natural. És a partir del segle XVI que la pastura i les ruptures en les riberes de la llacuna hi incrementen de manera significativa les entrades de sediment i acceleren el rebliment. A aquest increment també hi va contribuir de manera important l'activitat minera desenvolupada a la Sierra de Cartagena des de les primeres colonitzacions fenícies, cosa que es reflecteix, per la seva banda, en l'elevat contingut en metalls en els sediments [I.6].

### **I.1.2. Activitat minera**

L'elevada varietat de mineralitzacions de la regió va afavorir una transcendència minera que es perd en el temps. S'han trobat restes d'explotacions pertanyents a civilitzacions antigues com ibers, fenicis, cartaginesos i romans, que van extreure principalment or, plata, plom, zinc, ferro i coure. Fins a l'arribada dels romans, les tècniques d'explotació eren molt rudimentàries, però la seva tecnologia els va permetre construir pous miners de fins a 210 metres de profunditat. Els visigots i els musulmans van continuar amb la mineria, però sense cap mena d'avenç [I.8]. Tot i així, durant segles bona part del subsòl roman verge fins al segle XIX, quan comença l'explotació intensiva d'aquests recursos amb la mineria d'interior; aquest districte arriba a trobar-se, a finals del segle XIX, entre els primers productors de plom mundials. Però el model de mineria d'interior per cambres i pilars es va anar abandonant progressivament cap al 1969. Va ser en els dos districtes principals de la regió, la Sierra de Cartagena i Mazarrón, on es van realitzar la major part de les activitats i d'on es van obtenir la major part de minerals durant els segles XIX i XX. En ambdós, el plom és el metall estrella, però normalment aquest sempre es troba associat a altres elements.

La importància d'aquests jaciments ha estat clau per al desenvolupament de la regió en les diverses èpoques històriques i concretament en les tres etapes àlgides d'activitat minera: la dominació romana, la segona meitat del segle XIX i primer quart del XX, i la darrera etapa, des dels quaranta fins al cessament de l'activitat. La mineria romana es va centrar en la plata i posteriorment en el plom, procedents tant dels recobriments d'òxids com dels dipòsits de sulfurs. La segona gran etapa minera, ja al segle XIX, es va caracteritzar per una diversificació de les menes i les substàncies beneficiades. Després d'una fase inicial de "minería residual", aprofitant els runams romans, es passa a l'explotació intensiva dels recobriments d'òxids (etapa dels carbonats) i posteriorment a la dels dipòsits de sulfurs [I.3].

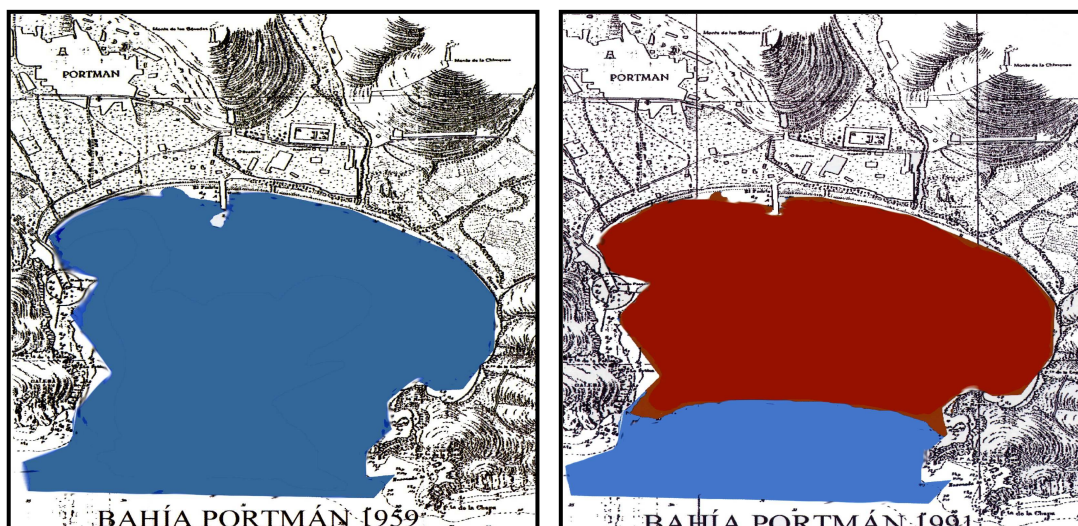
En les zones més riques, les de la Sierra de Cartagena, trobem un ampli ventall de formacions complexes de menes que contenen (juntament amb el plom) plata, zinc, coure, estany, ferro, manganès (en els seus diversos compostos: òxids, silicats, carbonats, etc.). La varietat i complexitat determinen una disposició irregular i diversa de les menes, que apareixen en forma de filons, bossades o capes i fins i tot en la d'antics abocadors d'escòries. La quantitat de menes de plom era enorme i la seva extracció relativament senzilla, però, normalment, amb un baix contingut metàl·lic i, a causa de la seva complexitat, amb problemes de fosa.

Si bé la producció ha estat sempre centrada en el plom i la plata, altres metalls van tenir gran importància en l'economia del districte. Així, la producció de zinc adquireix rellevància a partir de 1864, i arriba a un ritme anual superior a les 20.000 tm de metall. Anàlogament, el ferro passa a tenir gran importància minera a partir de 1873, i arriba a un ritme superior a les 300.000 tm any de mineral brut. La resta de minerals i conques quasi no són interessants, però podem destacar:

- Alum. Mineral d'extracció tradicional que se situa al terme de Mazarrón. La seva producció va créixer a mitjans del XIX per caure ràpidament a causa del progressiu esgotament fins a desaparèixer, a finals del XIX. Després de la Guerra Civil se'n tornarà a obtenir una certa producció.
- Sofre, que es troba sobretot al municipi de Lorca. La seva extracció va tenir una vida lènguida als s. XIX i XX. La seva època de major producció va ser la dècada de 1870.

A principis del segle XIX el primer obstacle que s'havia de superar per poder explotar el subsòl era el monopoli de l'Estat sobre diversos minerals i metalls i les dificultats que oposava a l'establiment de les empreses mineres. Amb la Llei de mines de 1825 s'inicia l'extracció contemporània dels minerals i al voltant de 1840 es pot situar l'inici d'una activitat més intensiva a la Sierra de Cartagena. Un cop superats els primers problemes tècnics, el primer atac a les reserves de la Sierra es va centrar en els antics abocadors d'escòries i en els carbonats superficials, més econòmic ja que l'extracció no tenia dificultat. Posteriorment s'aprofiten les galenes, que havien estat la base del renaixement miner però que s'havien deixat en un segon terme a causa de la seva major complexitat d'extracció i als problemes de fosa perquè es tractava de minerals complexos.

Amb l'avanç del segle XX s'agreugen els problemes en l'extracció. A l'esgotament de les reserves s'afegeix el col·lapse de l'economia internacional, que es plasmarà en el tancament dels mercats internacionals després de la crisi de 1929. Aquesta conjuntura es caracteritza, pel que fa a l'empresa, pel progressiu control de la Sociedad Minera Metalúrgica de Peñarroya (SMMPE) en la dècada de 1950, i el 1954 comença la mineria a cel obert amb l'obertura de la Corta Emilia. La Sierra de Cartagena va tornar a ser el centre de la producció murciana, amb una considerable inversió en rentadors per flotació diferencial, que permeten el benefici òptim de les menes complexes dels mantells, i es consolida als anys seixanta amb el desenvolupament de les grans explotacions mecanitzades a cel obert. Ha estat tal la importància d'aquest districte que, el 1967, el Descubierta Emilia ja era la *corta* minera per a l'extracció de plom més gran d'Europa, però una de les de menor llei Pb-Ag-Zn. L'explotació va ser rendible per a l'empresa SMMPE perquè disposava del coneixement geològic de la zona, la maquinària i els equipaments més eficients i amb el "factor climàtic", que permetia treballar durant tot l'any, ja que no hi havia períodes de nevades ni d'inundacions que interrompessin l'explotació [I.8]. L'elevat volum de mineral obtingut portarà a la necessitat de desfer-se dels estèrils. Després d'un període d'abocament al mar Menor, el 1959 Peñarroya obté el permís per abocar-los al Mediterrani, amb el conegut resultat del rebliment de la badia de Portmán (**figura I.5**). En aquesta etapa, les diverses explotacions de la Sierra van produir uns 89 milions de tm de mineral brut. D'aquests, 55 corresponien a una sola empresa (SMMPE), que liderava la mineria del districte, fins a finals de 1988.

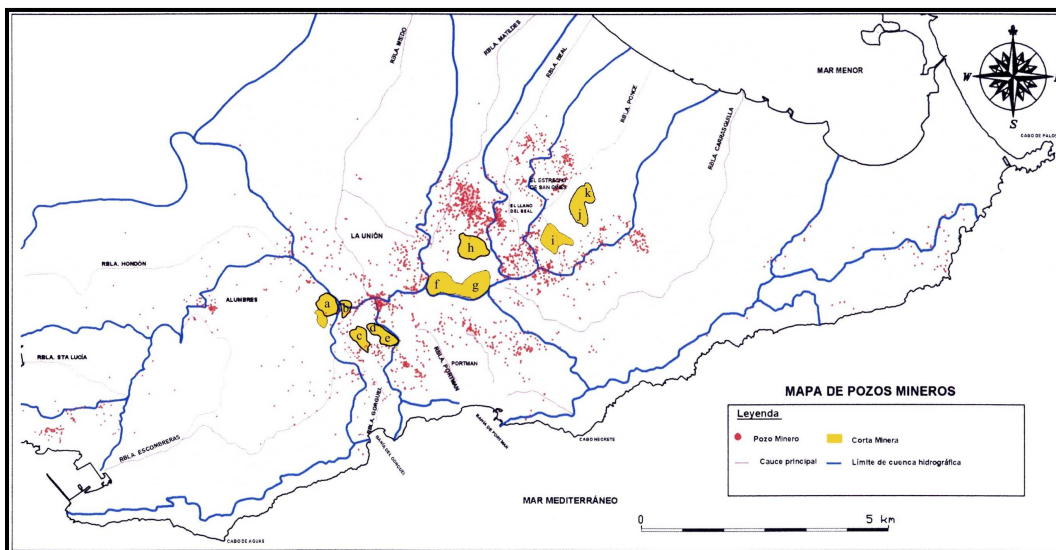


**Figura I.5.** Rebliment de la badia de Portmán a causa de l'abocament dels residus miners al mar Mediterrani a partir de 1959 [I.6].

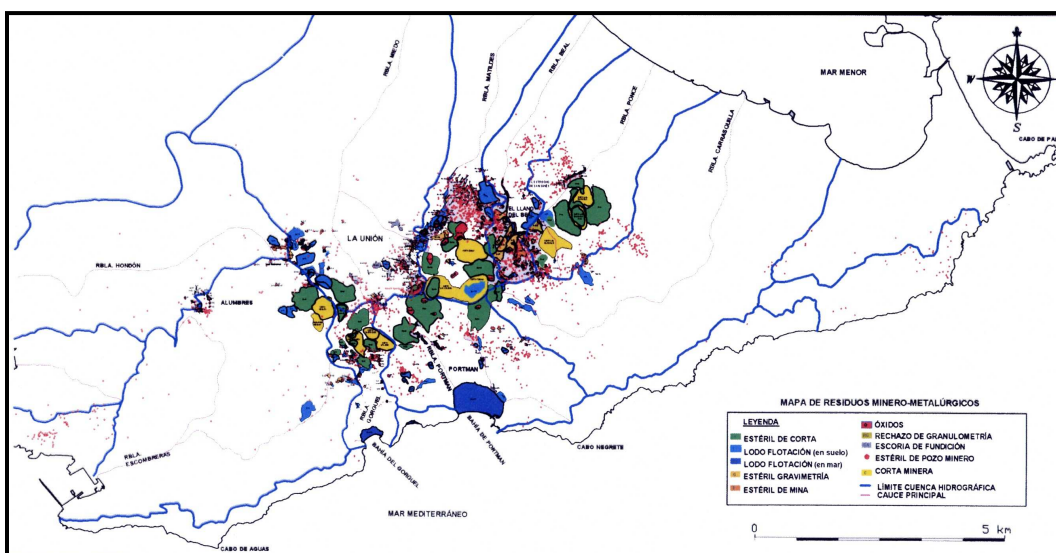
En la dècada dels noranta, amb una producció anual de ~2,5 milions de tm de tot-u, que en metall contingut suposen unes 30.000 tm de Zn, 25.000 tm de Pb i 27.000 kg de Ag, aquestes explotacions ocupaven el primer lloc en la producció espanyola de plom, amb un 30 % del total nacional, el primer lloc en la producció de plata, amb un 15 % del total, i el segon lloc en la de zinc, amb un 13 %, del total espanyol. Malgrat tot, la progressiva pèrdua de rendibilitat, paral·lela a l'esgotament de les reserves més riques, a més de les creixents restriccions mediambientals, sembla que determinaran la inviabilitat d'aquests jaciments i el tancament de les explotacions l'any 1991 [I.3, I.6, I.9, I.10,].

Aquesta prolongada activitat ha causat un gran impacte visual a la zona, a causa de la presència de nombroses acumulacions de residus i estèrils. Entre 1957 i 1987 es van mobilitzar més de 360 milions de tones de roca. Actualment existeixen ruïnes de forns de fosa, castelletes, edificis miners, *cortas* i centenars de pous. Com a conseqüència, les poblacions dels voltants de la zona minera veuen limitada la seva expansió per la presència de basses de residus (El Llano del Beal) o com Portmán, que s'ha vist desproveït de la seva badia, port i platja natural, ja que la seva badia ha estat reblerta amb 25 Mm<sup>3</sup> de llots de flotació abocats durant 30 anys (**figura I.5**).

El resultat de gairebé 3.000 anys d'activitat minera es mostra a les **figures I.6-I.7**, on s'observa la distribució d'aproximadament 1.900 pous miners, 12 *cortas* i diferents acumulacions de residus presents a l'àrea, que encara originen un aportament de residus al mar Menor com a conseqüència de l'arrossegament d'aquests per les pluges torrencials esporàdiques, des de les basses i a través de les rambles. Del total de residus presents, el 60 % en volum es troba en les conques de les rambles que desemboquen al mar Menor i el 40 % restant al Mediterrani, com es pot veure a la **figura I.7**, que mostra la distribució espacial de les acumulacions. La **taula I.2** mostra les característiques mineralògiques dels residus i la **taula I.3** recull les acumulacions existents de cada tipus de residu, així com el volum i l'àrea que ocupen. A la **figura I.8** podem veure imatges de cada tipus d'acumulació de residus. Les característiques fisicoquímiques d'aquests residus, que originen la contaminació dels sediments del mar Menor per metalls, estan determinades en una part important del procés a què se sotmetia el mineral a l'explotació minera. A continuació s'indiquen les seves característiques principals.



**Figura I.6.** Distribució de pous i cortas mineres (a Brunita, b Eloy, c Gloria, d Gloria Este, e San José, f San Valentín, g Tomasa, h Emilia, i Los Blancos III, j Los Blancos I, k Los Blancos II) [I.5].



**Figura I.7.** Distribució de les diferents acumulacions de residus miners presents a la Sierra de Cartagena - La Unión [I.5].

- Runam de mina, pou i corta: material provinent de les tasques d'excavació i preparació de les mines, pous i cortas. S'han generat des de temps preromans fins al 1991. La seva granulometria varia des de la fracció sorra fins a blocs.
- Basses de llots de flotació, formades pels residus procedents de rentadors de flotació diferencial. Totes les basses de residus es van construir de manera similar, variant la seva geometria en funció de la ubicació. Els llots són el producte del procés de tractament

metal·lúrgic en forma d'hidrobarreja amb diferents relacions sòlid/líquid; aquesta proporció condicionarà el tipus de bassa a la qual derivaran. La granulometria oscil·la entre sorra i llim. La producció de llots es va estendre durant el període 1940-1991.

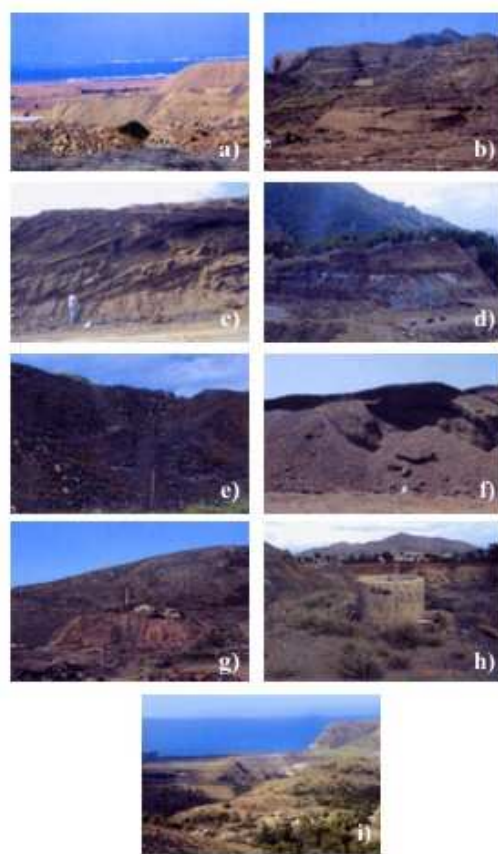
- Runam de granulometria i de concentració gravimètrica: són piles de material descartat dels processos de separació granulomètrica i gravimètrica. Els estèrils de concentració gravimètrica són material de mida de partícula entre grava i sorra, acumulats en dipòsits de mida reduïda, produïts des de temps preromans fins al 1950, quan se substitueix pel mètode de flotació diferencial. En els dipòsits de rebuig de granulometria es troba la porció superior a 30 mm, ja que en el procés de preconcentració dins del cicle de flotació diferencial els sulfurs es concentraven principalment a la fracció fina.
- Runam d'òxids: acumulacions de material oxidat (*gossan*) provinents de la cobertura dels jaciments de sulfurs; els minerals presents no eren processables pels procediments disponibles, ja que es trobaven en forma d'òxids. Aquests residus es van dipositar entre 1953 i 1991. La mida de gra oscil·la entre graves i llims.
- Runam d'escòries de fosa (localment anomenats *gacheros*): són acumulacions de material resultant dels processos de fosa en forns, de mida de partícula grossa i textura vítrica.

**Taula I.2.** Característiques mineralògiques dels residus presents a la Sierra de Cartagena - La Unión, les dades es troben en % en pes.

	Estèril <i>corta</i>	Llots flot.	Llots flot.(mar)	Estèril gravim.	Estèril mina	Òxids	Estèril granul.	Escòria de fosa	Estèril pou
Hematites	5,6	11	6,6	12	5,2	12	18		7,6
Magnetita	6,1	6,1	4,1	4,1	2,2	2,2	4,1		2,1
Galena		4,2	Traça	Traça	1,2	1,2	1,1		Traça
Greenalita	Traça	Traça	Traça	Traça		Traça	Traça		
Esfalerita	2,1	Traça	1,2	1,1	Traça	1,1	Traça		1,1
Calcopirita	4,2	1,5	1,2	1,2	Traça	6,3	Traça		2,5
Pirrotina		Traça	Traça	Traça	Traça	Traça	1,2		
Pirita	3,1	7,1	6,1	8,2	5,2	5,6	10		7,1
Caolinita	9,5	9,5	9,5	2,5	8,7	1,5	9,5		7,1
Dolomita	2,3	2,3		Traça	Traça	Traça	2,3		Traça
Calcita	Traça	1,2		Traça	Traça	Traça	Traça		1
Moscovita	3,2	1,1	1,3	1,1	1	1,1	Traça	1,1	1,2
Quars	20	13	14	10	21	21	10	14	17
Clorita	2,1	3,1	2,1	2,1	3,2	2,2	Traça		2,1
Feldespat. Ca	Traça	1,6	1,2	Traça	Traça	Traça	Traça		Traça
Feldespat. Na-Ca	Traça	1,7	1,3	2,1	Traça		Traça	1,2	Traça
Siderita	Traça	Traça	Traça	Traça	Traça	Traça	Traça		Traça

**Taula I.3.** Nombre d'acumulacions, volum i àrea ocupada per cada tipus de residu miner.

<b>Tipus de residu</b>	<b>Nombre d'acumulacions</b>	<b>Volum (Mm<sup>3</sup>)</b>	<b>Àrea (km<sup>2</sup>)</b>
Estèril de <i>corta</i>	32	136	4,21
Estèril de mina	176	3	0,48
Estèril de pou	1.902	0,5	0,02
Llots de flotació	89	23	2,18
Llots de flotació (mar)	3	25	0,73
Estèril de gravimetria	119	3,7	0,65
Estèril de granulometria	1	0,6	0,06
Òxids	11	6,9	0,26
Escòria de fosa	19	0,7	0,13
<b>Total</b>	<b>2.352</b>	<b>199</b>	<b>8,72</b>



**Figura I.8.** Imatges dels diferents tipus de residus miners que es troben a l'àrea d'estudi: *a)* estèrils de *corta*, *b)* llots de flotació, *c)* estèril de concentració gravimètrica, *d)* òxids, *e)* escòries de fosa, *f)* estèril de granulometria, *g)* estèril de mina, *h)* estèril de pou, *i)* llots de flotació a la badia de Portmán.

## I.2. EL PROBLEMA AMBIENTAL DELS RESIDUS MINERS ABANDONATS

L'exploració minera va sempre acompanyada de canvis profunds en l'escorça terrestre, a més d'alterar el sòl, vegetació, fauna, hidrologia i paisatge. La incidència de la mineria en el medi ambient i els residus generats per les activitats mineres són molt variables, en funció del mineral que s'exploti i del tipus de tractament aplicat. L'abandonament de les mines sense que s'apliquin mesures de restauració crea greus problemes ambientals. Quant als residus, no només hi ha el runam, sinó també grans quantitats de pols i altres elements fins que es produeixen al voltant de l'exploració i afecten la zona. Quan l'extracció del mineral es produeix en profunditat, el volum dels residus generats és més gran. En les extraccions a cel obert són necessaris la trituració, rentatge i concentració, tasques que es realitzen en instal·lacions contigües que moltes vegades són de grans dimensions. Aquest tipus d'extracció és el que provoca més perjudicis ambientals [I.11].

Alguns dels efectes ambientals més perjudicials de la mineria són el resultat del processament dels materials extrets. Normalment, la mena és només una part, sovint una part petita, del material que s'ha d'excavar. S'apliquen diversos processos de refinament per separar la fracció útil de mineral, que deixen una important quantitat de residu d'estèrils que són acumulats en diferents estructures, en piles els materials de mida gruixuda i en basses els residus de mida de gra fi. Els riscos associats a aquestes acumulacions de residus estan relacionats amb les seves propietats geotècniques i la potencial generació de lixiviats [I.8, I.12].

S'ha prestat molt poca atenció a l'abocament de residus de mineria. En el passat, la majoria d'aquests residus eren abocats indiscriminadament, dipositats en instal·lacions inadequades o simplement abandonats a la vora d'un curs d'aigua [I.13]. Com a resultat d'aquestes pràctiques, nombroses mines (les que operaven abans de les darreres dècades) i plantes de processament del mineral que van ser abandonades un cop el mineral es va esgotar, són actualment fonts (potencials o en curs) de contaminació ambiental [I.14- I.16]. De fet, actualment no existeix legislació que reguli la mineria metàl·lica de manera global. És a partir dels accidents produïts pel trencament de dics de les basses a Aznalcóllar (1998, Espanya) i a Baia Mare (2000, Romania) que s'inicia el desenvolupament de normatives adequades d'àmbit regional, estatal i europeu. El març del 2006 es va publicar la Directiva 2006/21/CE



sobre la gestió dels residus d'indústries extractives. Malgrat tot, no existeix una normativa que englobi tots els efectes associats amb l'abandonament d'una zona minera [I.8].

### **I.3. AVALUACIÓ DE LA CONTAMINACIÓ PER METALLS I EL SEU EFECTE**

La mobilitat i disponibilitat dels metalls depenen de les seves característiques fisicoquímiques i de la manera específica com s'enllacen a la matriu sòlida. Per tant, per tenir un coneixement adequat de la toxicitat, biodisponibilitat, transport, efecte i destí de la majoria dels elements i substàncies, es requereix normalment conèixer alguna cosa més que les seves concentracions totals individuals. Per descriure aquesta distribució dels elements en diferents formes fisicoquímiques o espècies, s'utilitza el terme *especiació*, i els mètodes corresponents o tècniques analítiques que permeten el seu estudi s'anomenen *tècniques d'especiació*. D'acord amb la definició de la IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry), *especiació* és "el procés que ens porta a la identificació i determinació de les diferents formes atòmiques o moleculars i als estats d'oxidació d'un anàlit en una matriu" [I.17]. Mentre que existeixen diferents mètodes d'especiació elemental per a matrius aquoses, la implementació d'aquesta metodologia per a l'especiació en matrius sòlides es troba en un estat menys desenvolupat. Els mètodes directes per a l'especiació en estat sòlid presenten generalment baixa sensibilitat per a l'anàlisi de traces o bé requereixen un equipament molt especialitzat. Com a alternativa, l'especiació en sòls i sediments es basa sovint en l'ús de procediments d'extracció (simples o seqüencials), que permeten mesurar àmplies formes o fases que en molts casos són suficients per als objectius ambientals (per exemple: mòbil/biodisponible, unit a carbonat, residual, etc.) [I.18, I.19]. La mesura de la composició de les fraccions en els procediments d'extracció requereix tècniques analítiques acurades i ràpides que permetin l'anàlisi d'un gran nombre d'anàlits en un temps raonablement curt. Amb aquesta finalitat, normalment s'apliquen tècniques d'anàlisi multielemental, com l'espectrometria d'emissió atòmica amb plasma acoblat inductivament (ICP-OES) o l'espectrometria de masses amb plasma d'acoblament induït (ICP-MS).

### I.3.1. Extraccions simples

Els estudis de mobilitat de metalls en sòls i sediments es basen en els possibles enllaços presents. La composició del sòl, les fases minerals i amorfes i la matèria orgànica present tindran un paper molt important. Aquells més fàcilment substituïts són els ions enllaçats a les argiles, com ara caolinita, il·lita o montmoril·lonita que, a causa dels processos de bescanvi iònic, passen a la fase líquida. Els components enllaçats absortivament a la superfície d'òxids de ferro i manganès són una mica més difícils d'alliberar. Els precipitats lleugerament solubles com carbonats, sulfurs i hidròxids dels metalls formen un altre grup amb mobilitat inferior. Els metalls poden també estar presents com a coprecipitats com a resultat de les propietats de coprecipitació d'hidròxids lleugerament solubles com els de ferro. Els metalls enllaçats a la matèria orgànica també poden trobar-se en forma lleugerament soluble. Els ions metàl·lics poden ser retinguts per oclusió en els precipitats cristal·lins o bé es poden incorporar a l'estructura cristal·lina dels minerals (isomòrficament) [I.20].

Les extraccions simples estan dissenyades per dissoldre una fase específica del sòl, sediment o residu [I.21]. A la **taula I.4** es mostren els agents extractants més utilitzats i les fases extretes amb cadascun.

Actualment, molts procediments d'extracció simple (tests de lixiviació) basats en extraccions aquoses o àcides es referencien àmpliament com a assaigs de referència en organismes legislatius nacionals i internacionals. Concretament, els tests de lixiviació s'apliquen a residus per obtenir informació sobre l'alliberament de compostos específics sota certes condicions. Per tant, aquesta informació s'utilitza per avaluar el risc d'aquests residus quan es dipositen en un abocador o per caracteritzar-los i classificar-los en termes de risc. A la **taula I.5** es presenten diferents tests de lixiviació utilitzats en diferents països per a la regulació de matèries perilloses, en tots ells el residu es posa en contacte amb una solució extractant en la qual s'analitza el contingut de pol·luents i aquest ha de ser inferior als límits establerts.

## INTRODUCCIÓ

---

**Taula I.4.** Extraccions simples [I.22].

<b>Metall traça extret</b>	<b>Agent extractant</b>	<b>Comentaris</b>
Soluble en aigua	H <sub>2</sub> O	Baixa capacitat tampó
Intercanviable (feble enllaç electrostàtic)	CaCl <sub>2</sub> 0,01-0,1 M CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 1 M (pH 7) NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> 0,1 M Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 0,1 M NaNO <sub>3</sub> 0,1 M AlCl <sub>3</sub> 0,3 M BaCl <sub>2</sub> 0,1 M MgCl <sub>2</sub> 1 M Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> 1 M (pH 7)	Solucions tamponades (pH forçat) o no tamponades (el pH de l'extractant depèn principalment del pH del sòl o el sediment)
Sensible a processos d'acidificació (ex.: unit a carbonats)	CH <sub>3</sub> COOH 0,11-0,43 M HCl 0,1-1 M CH <sub>3</sub> COONa 1 M (pH 5, CH <sub>3</sub> COOH)	No adequat per a sòls calcaris
Sensible a processos de complexació	EDTA 0,01-0,05 M DTPA 0,005 M (sòls calcaris) CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> - CH <sub>3</sub> COOH/EDTA	Agents complexants de sals d'amoni o sodi
Fàcil o moderadament reduïble	NH <sub>2</sub> OH·HCl 0,1-0,5 M (pH 1,5, HNO <sub>3</sub> ) (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> /H <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Els reactius poden reduir els potencials de reducció del sistema
Oxidable	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 8,8 M- CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> 1 M (pH 2, HNO <sub>3</sub> ) NaClO 0,7 M (pH 9,5) K <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> o Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	

Si considerem que el pH és un factor clau en la lixiviació dels pol·luents els assaigs de lixiviació a pH controlat (pH stat) són adequats per a predir la disponibilitat de pol·luents en els residus [I.23, I.24]. Mitjançant aquests experiments es pot veure la resposta en front a l'addició d'una quantitat d'àcid o base i, per tant, de la vulnerabilitat davant un estrés extern. Recentment s'ha introduït l'avaluació de la dependència de la lixiviació de pol·luents en funció del pH en la gestió de residus [I.24].

**Taula I.5.** Alguns tests de lixiviació escollits per a estudis dels residus en diferents organismes.

<b>Test de lixiviació</b>	<b>País/Regió</b>
DIN 38414 S4	Alemanya
AFNOR X31-210	França
JST-13	Japó
prEN 12457	Europa
EP Tox Method 1310	EUA
TCLP Method 1311	EUA

Encara que a Espanya no existeix un test de lixiviació característic per a la regulació de residus, se solen utilitzar tests que s'apliquen en altres països. Així, la norma alemanya (DIN 38414-S4) és, actualment, la que utilitza el Consell Regulador dels Residus de Catalunya com a criteri d'acceptació per a la disposició d'un residu en un abocador municipal.

### I.3.2. Esquemes d'extracció seqüencial

Per avaluar l'efecte potencial de la contaminació per metalls, no n'hi ha prou de mesurar només les concentracions de metall total, sinó que també és important establir les proporcions de metalls presents en les fraccions fàcilment solubles o poc solubles del sediment, sòl o residu. En els processos d'extracció seqüencial s'apliquen diferents extractants successivament al sediment, sòl o residu per extreure'n selectivament els elements en una particular forma química. Cada extractant és químicament més actiu o diferent que l'anterior [I.20, I.25- I.27].

Les extraccions seqüencials permeten obtenir més informació que les extraccions simples i tenen diversos avantatges [I.28]:

- Els processos d'extracció aplicats són comparables als que es donen a la natura.
- La suma del metall extret en totes les etapes ha de representar aproximadament el cent per cent, de manera que els resultats són autoavaluables.
- Són una eina essencial per establir el fraccionament en mostres naturals.
- Es poden utilitzar per a l'estimació de la mobilitat potencial dels metalls en condicions ambientals canviants.

El procediment d'extracció més àmpliament utilitzat és el proposat per Tessier [I.29, I.30], que ha estat modificat per diversos autors [I.31- I.33]. La majoria d'aquestes modificacions es van realitzar per aconseguir un aïllament més específic dels òxids de ferro i manganès. S'han desenvolupat altres esquemes d'extracció seqüencial aplicant-los a diferents tipus de mostres ambientals, tal com es pot veure a la **taula I.6** [I.34- I.37].

Els problemes bàsics que presenten aquests esquemes estan relacionats amb la falta de selectivitat dels reactius i a la readsorció dels elements solubilitzats entre les diferents fases durant l'extracció. Els resultats obtinguts depenen dels reactius seleccionats i de l'ordre en el qual la mostra s'exposarà a aquests. Per tant, l'especiació o fraccionament correspon a un

paràmetre “definit operacionalment” [I.38]. Això significa que les “formes” dels metalls estan definides per la determinació d’elements extraïbles, utilitzant un procediment determinat, i per tant, la significança dels resultats analítics depèn del procediment d’extracció utilitzat [I.33].

La falta d’uniformitat entre tots els procediments existents sovint no permet la comparació dels resultats. Per tant, l’única possibilitat d’aconseguir una comparació raonable entre diferents estudis és referir-se a esquemes ben definits que han estat provats, harmonitzats i establerts com a mètodes estandarditzats [I.18]. Amb aquest objectiu, el Community Bureau of Reference (BCR), actualment Standards Measurement and Testing Programme (SM&T), va proposar el 1992 un procediment d’extracció en 3 etapes que consta d’una extracció amb àcid acètic (etapa 1: fracció intercanviable i soluble en àcid), una extracció amb clorur d’hidroxilamina (etapa 2: fracció reduïble) i finalment un atac amb peròxid d’hidrogen seguit d’una extracció amb acetat d’amoni (etapa 3: fracció oxidable). Una vegada l’esquema va estar dissenyat, es va sotmetre a diferents exercicis d’intercomparació, i després d’algunes millores respecte a l’original (l’ajust del pH i la concentració de la dissolució de clorur d’hidroxilamina), es va establir com a mètode estàndard [I.26, I.39]. Des de llavors, l’esquema d’extracció seqüencial BCR modificat s’ha aplicat a una gran varietat de matrius, com sediments, sòls, fangs i residus [I.22, I.40].

### **I.3.3. Els sulfurs volàtils (AVS)**

Els contaminants que entren en un sistema aquàtic poden esdevenir associats amb les partícules de sediment, que poden actuar no només com a reservori sinó també com a font de contaminants en aquests sistemes [I.41, I.42]. El destí d’aquestes substàncies en els sediments està relacionat amb la naturalesa i extensió de les transformacions biogeoquímiques, així com amb la seva mobilitat relativa o la degradació en condicions redox variables. A més, processos advectionals com ara resuspensió i bioturbació poden retornar aquestes substàncies a la columna d’aigua, on poden esdevenir disponibles per a l’assimilació per part de la biota pelàgica.

**Taula I.6.** Esquemes d'extracció seqüencial més utilitzats amb els diferents agents extractants que s'utilitzen (seqüencialment) i la fracció de metalls extreta en cada cas [I.28].

<b>AUTORS</b>	<b>EXTRACTANTS</b>	<b>FRACCIONS</b>
Gatehouse et al.	H <sub>2</sub> O NH <sub>4</sub> Ac/HAc NH <sub>2</sub> OH·HCl/HAc H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HNO <sub>3</sub> N <sub>2</sub> N <sub>4</sub> ·HCl HClO <sub>4</sub>	Solubles en aigua Intercanviables Òxids Sulfurs i orgànics Fases de Fe, no silicats Residuals
Tessier et al.	MgCl <sub>2</sub> NaAc/HAc NH <sub>2</sub> OH·HCl/HAc H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HNO <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> Ac HF/HClO <sub>4</sub>	Intercanviables Carbonats Òxids Orgànics Residuals
Sposito et al.	KNO <sub>3</sub> NaOH EDTA HNO <sub>3</sub>	Intercanviables Components adsorbits Orgànics Carbonats i sulfurs
Miller i McFee	H <sub>2</sub> O KNO <sub>3</sub> Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> EDTA NH <sub>2</sub> OH·HCl/HNO <sub>3</sub> Citrat de sodi/NaHCO <sub>3</sub> /Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> HNO <sub>3</sub> HNO <sub>3</sub> /H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Solubles en aigua Intercanviables Orgànics Carbonats, oclusos de Fe (amorf) Òxids de Mn oclusos Òxids de Fe oclusos cristal·lins Sulfurs Residuals
Psenner et al.	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> NaOH HCl NaOH calent	Orgànics i húmics (parcialment) Húmics Carbonats, hidròxids de Fe, sulfurs (parcialment) Caolinita (parcialment), sulfurs
Shuman i Hargrove	Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NaOCl NH <sub>2</sub> OH·HCl/ NH <sub>4</sub> Ac (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Ox Àcid ascòrbic / Tampó oxalat HCl/HF/HNO <sub>3</sub>	Intercanviables Orgànics Òxids de Mn Òxids de Fe (amorfs) Òxids de Fe (cristal·lins) Residuals
Kersten i Förstner	NH <sub>4</sub> Ac NaAc/HAc NH <sub>2</sub> OH·HCl/HNO <sub>3</sub> Tampó oxalat H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /HNO <sub>3</sub> /NH <sub>4</sub> Ac HNO <sub>3</sub>	Intercanviables Carbonats Òxids de Mn Òxids de Fe (amorfs) Sulfurs i orgànics Residuals
Zeien i Brümmer	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> Ac NH <sub>2</sub> OH·HCl/NH <sub>4</sub> Ac (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> EDTA (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Ox Àcid ascòrbic / Tampó oxalat HF/HClO <sub>4</sub> /HNO <sub>3</sub>	Intercanviables (no adsorbits específicament) Intercanviables (adsorbits específicament) Òxids de Mn Orgànics Òxids de Fe (amorfs) Òxids de Fe (cristal·lins) Residuals
Hirmer et al.	H <sub>2</sub> O NH <sub>4</sub> Ac C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /CH <sub>3</sub> OH C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> /CH <sub>3</sub> OH/KOH HCl HF HCl/HClO <sub>4</sub> /HNO <sub>3</sub>	Solubles en aigua Intercanviables Orgànics solubles (extractables en solvent) Orgànics solubles (àcids húmics i fúlvics) Matriu mineral (fàcilment soluble) Matriu mineral (difícilment soluble) Orgànics insolubles

La degradació microbiològica de la matèria orgànica durant la diagènesi potencia les transformacions químiques en l'aigua de porus i la fase sòlida dels sediments marins. Com a resultat de la mineralització de la matèria orgànica, els metabòlits i les espècies associades als metalls són extrets directament a l'aigua de porus [I.43]. Com que els metalls tant es poden adsorbir en els sediments com ser acumulats pels organismes bentònics a nivells tòxics, la biodisponibilitat i consegüent toxicitat dels metalls han esdevingut l'estudi de major interès relacionat amb els sediments [I.44].

Els tests de toxicitat del sediment són instruments cada vegada més importants per predir els possibles efectes negatius i la biodisponibilitat dels metalls en els sediments per als organismes bentònics. El problema més difícil en l'avaluació de la toxicitat del sediment és la comparació dels resultats obtinguts en diferents condicions del sediment i la seguretat en l'extrapolació dels resultats de tests al laboratori a la situació real. La predicció acurada de la toxicitat dels metalls en els sediments requereix el coneixement de la geoquímica del sediment en la partició entre sediment i aigua intersticial (de porus), la forma del metall i les vies d'exposició de l'organisme.

Les concentracions de metall a l'aigua intersticial són un indicador útil per predir la toxicitat dels sediments. Una de les fases enllaçants clau en el control de l'activitat catiònica del metall i la toxicitat en el sistema sediment-aigua intersticial són els sulfurs volàtils (AVS) [I.45]. Els AVS són un paràmetre definit operacionalment i són una mesura de la quantitat de sulfurs disponible en el sediment, és a dir, els sulfurs presents en el sediment solubles en àcid en fred [I.46, I.47]. La idea general és que, a causa de la baixa solubilitat dels sulfurs metàl·lics precipitats, els metalls no estaran disponibles perquè els organismes els assimilïn en presència d'un excés de sulfur disponible [I.48, I.49].

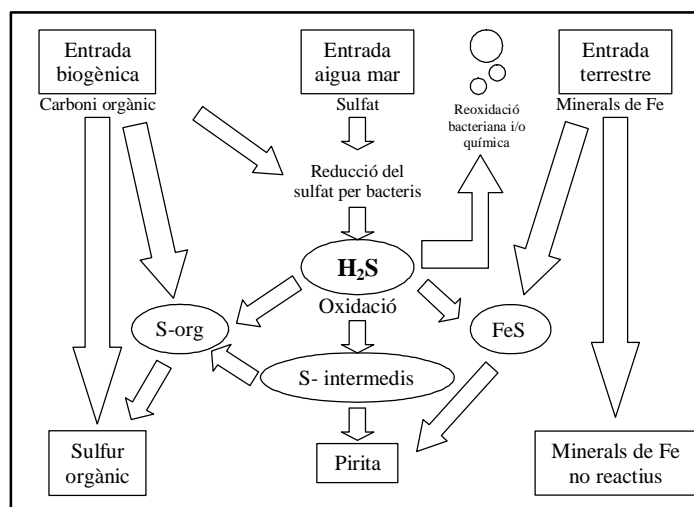
El cicle del sofre en el medi és complex per l'àmplia varietat de formes naturals existents i estats d'oxidació. Els minerals que contenen sofre precipiten i s'acumulen sota diferents vies en sediments marins, de llac i de riu. En sediments aquàtics no contaminats, les espècies de S es troben en associació amb Fe, sulfur de Fe, normalment present en forma de pirita ( $\text{FeS}_2$ ) o mackinawita ( $\text{FeS}$ ), que és el sulfur metàl·lic més comú en els sediments [I.50].

El cicle del sofre sedimentari comença amb l'oxidació de compostos orgànics simples pels bacteris sulfatoreductors (vegeu la **figura I.9**). El procés implica l'oxidació del carboni orgànic acoblada a la reducció de sulfat a sulfur. El sulfur produït pot seguir diferents vies

diagenètiques. Primer, es pot difondre cap a la columna d'aigua o cap a una zona oxidada dins del sediment i ser reoxidat. L'oxidació pot ser biòtica o abiòtica i pot produir sulfat, així com espècies de sofre d'estat d'oxidació intermedi, com ara sofre elemental, tiosulfat, sulfit, politionats i polisulfurs. Alternativament, el sulfur dissolt pot reaccionar amb el Fe (II), provinent de la reducció de minerals, i precipitar monosulfurs de Fe. En una tercera via el sulfur d'hidrogen pot reaccionar amb la matèria orgànica detrítica per formar compostos orgànics de sofre. Finalment, els anions sulfoxi, polisulfurs i/o el sofre elemental formats durant l'oxidació parcial del sulfur dissolt poden reaccionar amb la matèria orgànica per formar polisulfurs orgànics o amb ions Fe (II) i/o els monosulfurs de Fe per completar el procés de formació de la pirita [I.51].

El mètode de determinació dels AVS es basa en la formació de  $H_2S$ , a partir dels sulfurs de la mostra, per acidificació amb HCl. Després d'eliminar l'àcid sulfhídric de la mostra, el sediment acidificat és filtrat i es determinen els metalls extrets simultàniament (SEM) per espectroscòpia d'absorció atòmica o per espectroscòpia d'emissió atòmica amb plasma d'acoblament induït (ICP) [I.52].

Els sulfurs volàtils (AVS) s'han indicat com una de les claus de la partició entre fases controlant les activitats d'alguns cations metàl·lics bivalents en els sediments. Els AVS comprenen principalment els sulfurs lliures, el monosulfur de ferro (FeS), la mackinawita cristal·lina (FeS), pirrotina (FeS), greigita ( $Fe_3S_4$ ), així com els sulfurs d'altres metalls bivalents i que estan definits operacionalment com els sulfurs del sediment que són alliberats pel tractament del sediment amb àcid clorhídric en fred.



**Figura I.9.** Representació esquemàtica del cicle del sofre sedimentari.



Els metalls bivalents (Cd, Cu, Pb, Ni i Zn) trobats durant l'extracció dels AVS es defineixen operacionalment com els metalls extrets simultàniament (SEM). Aquests poden tenir un paper important en el desplaçament del ferro dels monosulfurs per formar sulfurs metàl·lics insolubles i, per tant, es consideren com a no disponibles pels organismes bentònics. Els SEM es consideren una eina útil per a la valoració de la biodisponibilitat potencial de les concentracions de metall en comparació amb els AVS [I.53]. Alguns estudis consideren que els sediments amb una relació molar de SEM/AVS més gran que 1 presentarien una toxicitat potencial; d'aquesta manera, els sediments amb una relació molar menor que 1 no mostrarien toxicitat [I.48, I.54]. El fonament teòric d'aquestes afirmacions es troba en el fet que els metalls trobats en els SEM que no estan enllaçats als AVS es troben en l'aigua de porus i podrien estar disponibles per als organismes bentònics. No obstant això, les concentracions de metalls en l'aigua de porus normalment són baixes en sediments on la relació SEM/AVS és més gran que 1. Per tant, el model dels AVS només és realment vàlid quan no indica toxicitat ( $AVS \geq SEM$ ) [I.45, I.55]. D'aquesta manera, si trobem una relació SEM/AVS superior a 1 ens indicaria que els sulfurs no són el component principal dels sediments que enllaça als metalls [I.56].

### **I.4. ÚS D'ORGANISMES COM A BIOMONITORS DE LA CONTAMINACIÓ**

En l'avaluació de l'impacte de la contaminació per metalls en el medi marí és imprescindible la caracterització fisicoquímica del sediment, que constitueix una part important d'aquest treball, així com l'estudi de les respostes biològiques.

S'ha trobat sovint que el contingut de metalls dels macròfits submergits està correlacionat amb els nivells observats en el sediment on estan arrelats. No obstant això, les característiques del sediment poden influenciar en aquest model, per exemple: el contingut en matèria orgànica, la proporció d'argiles, el contingut de carbonats, la capacitat de bescanvi catiònic (CEC), el potencial redox, els sulfurs volàtils (AVS), i altres components del sediment poden actuar com a receptacles d'adsorció i modificar el comportament [I.57].

Per sobre d'un nivell de biodisponibilitat, els metalls són tòxics per als organismes. No obstant això, la toxicitat d'un metall determinat varia per als organismes per diverses raons. La capacitat dels organismes d'assimilar, emmagatzemar, eliminar o metabolitzar els metalls

difereix considerablement. És la biodisponibilitat d'un metall més que la seva mera presència en el medi el que s'ha de considerar en els estudis toxicològics, i la biodisponibilitat depèn fortament de l'especiació química [I.58].

Per avaluar l'impacte de la contaminació, normalment disposem de tres tipus de mesures: les concentracions en aigua, sediments i biota, que es comenten amb més detall a continuació [I.59].

- La mesura de les concentracions de metall dissolt en aigua de mar normalment presenta problemes d'anàlisi perquè aquestes concentracions solen ser baixes (a vegades, en el límit de detecció del mètode) i sovint és necessària una preconcentració. A més, les concentracions de metall dissolt varien molt amb el temps (cicle de pluges, aportació d'aigua dolça, etc.). No obstant això, el fet més important és que la concentració de metall dissolt ens proporciona l'avaluació del metall total present, no de la fracció que és biodisponible (disponible per a l'assimilació i acumulació per part dels organismes marins). És aquesta fracció biodisponible que és potencialment tòxica i de rellevància ecotoxicològica.
- L'anàlisi dels sediments supera alguns d'aquests desavantatges, ja que els metalls s'acumulen en els sediments, particularment en els sediments rics en matèria orgànica, i per tant, les concentracions són elevades, fàcilment mesurables i molt menys susceptibles de contaminació accidental. També hem de tenir en compte que la determinació del metall total no és el mateix que el biodisponible i que resulta molt difícil relacionar aquestes dues mesures.
- Per altra banda, com a conseqüència de la persistència dels pol·luents en el medi ambient, es produeix la bioacumulació per bloqueig del procés de biodegradació de molècules, ja sigui perquè els organismes no tenen els enzims necessaris, perquè es produeix una disfunció enzimàtica o perquè les molècules són recalcitrants i la seva estructura química no permet la biodegradació [I.60]. D'aquesta manera, es poden arribar a tenir elevades concentracions en els organismes marins que són fàcilment mesurables. Aquestes són una mesura integrada en el temps de l'aportament de metall biodisponible en comptes del metall total. S'està mesurant la fracció de metall de rellevància ecotoxicològica directa [I.59].

L'ús d'organismes marins com a bioindicadors per a la pol·lució de metalls traça és molt comú actualment. Es defineix com a *bioindicador* aquell organisme o comunitat l'existència, característiques estructurals, funcionament i reaccions del qual depenen del medi en el qual es desenvolupen i canvien en modificar-se les condicions ambientals. Aquests es poden classificar atenent criteris diferents:

*a-* Segons el grau de sensibilitat davant els estímuls ambientals: molt sensibles, sensibles, poc sensibles i resistent.

*b-* Segons com responen als estímuls:

- Detectors: viuen naturalment en una àrea i simplement mostren respostes com canvis de vitalitat, mortalitat, capacitat reproductora, abundància, etc. davant els canvis ambientals que es produeixen en el seu entorn.
- Explotadors: la seva presència indica la probabilitat d'una pertorbació. Amb freqüència, són organismes que, d'una manera més o menys sobtada, es fan molt abundants en un lloc, quasi sempre per la falta de competidors, que han estat eliminats prèviament per la pertorbació.
- Sentinelles: sensibles o molt sensibles, que s'introdueixen artificialment en un medi i funcionen com a alarmes perquè detecten ràpidament el canvis.
- Acumuladors: en general, són resistent a certs compostos perquè són capaços d'absorbir-los i acumular-los en quantitats mesurables.
- Organismes test o bioassaig: s'utilitzen en el laboratori com a reactius per detectar la presència i/o la concentració de contaminants.

*c-* Segons la possibilitat de quantificar la resposta [I.59]:

- Bioindicadors en sentit estricte: aquells que, amb la seva presència o absència i abundància, indiquen els efectes d'un factor ambiental de manera qualitativa; poden ser tant positius per la seva presència i/o abundància com negatius per la seva absència.
- Biomonitor: indiquen la presència de contaminants o pertorbacions no només de manera qualitativa, sinó també de manera quantitativa, perquè les seves reaccions són, d'alguna manera, proporcionals al grau de contaminació o pertorbació [I.61]. Així, en

el cas de contaminació metàl·lica, podem analitzar els seus teixits per determinar la biodisponibilitat dels metalls en l'hàbitat.

Els requisits que han de complir els bioindicadors són:

- Donar respostes d'interès per a l'ecosistema que s'està estudiant i que aquestes siguin relativament fàcils d'observar i/o mesurar.
- Tenir límits de tolerància estrets respecte a variables ambientals.
- Donar respostes diferents davant d'estímul diferents.
- Han de tenir com a font del que es vol estudiar només allò que ve del focus de pertorbació.
- Haurien de ser sedentaris o tenir una capacitat de dispersió limitada.
- Ser fàcils de mostrejar (ser una espècie comuna i estar en quantitat suficient per no alterar ni destruir la població si s'han de fer mostreigs successius).
- Han de ser resistents a l'acumulació de contaminants (especialment els bioindicadors acumuladors).
- Han de tenir un temps de vida suficientment llarg perquè es puguin manifestar les respostes. És preferible que siguin de llarga vida per poder mostrejar diferents grups d'edat.

Hem vist que existeix la possibilitat de quantificar la contaminació mitjançant l'ús de biomonitorització, que, com ja hem dit, són un tipus de bioindicador que presenta reaccions que d'alguna manera són proporcionals al grau de contaminació o pertorbació. Monitoritzar és realitzar observacions sistemàtiques de paràmetres relacionats amb un problema específic, dissenyades per donar informació sobre les característiques del problema i els seus canvis amb el temps. La monitorització pot ser fisicoquímica o biològica (biomonitorització). Un dels objectius principals de la monitorització és detectar i mesurar canvis en el medi ambient, de manera que les dades que s'obtinguin només seran útils si en tenim altres de referència per comparar. Seria ideal que fossin àrees totalment lliures de contaminació, però això actualment ja no és possible.

La biomonitorització es pot realitzar directament o indirectament:

- Biomonitorització directa: es monitoritza la contaminació mesurant la quantitat de contaminants en els organismes.
- Biomonitorització indirecta: es basa a detectar els canvis visibles o mesurables que el medi provoca en els organismes:
  - en individus d'una espècie
  - en la població d'una espècie
  - en la comunitat
  - en un ecosistema

Respecte a com es poden fer aquests estudis, a més de tot un conjunt de mesures fisicoquímiques possibles, existeixen una gran quantitat de processos, variables, respostes o símptomes avaluables en biomonitorització. Quan es fa biomonitorització indirecta en individus d'una espècie, es poden estudiar canvis fisiològics, citològics o morfològics. Els canvis ambientals es tradueixen en alteracions de fenòmens fisiològics, normalment perquè molècules de substàncies que les cèl·lules utilitzen en el seu metabolisme o estructura han estat afectades; per aquestes mateixes raons es poden observar canvis citològics que a vegades no es manifesten més que microscòpicament. D'aquesta manera, canvis fisiològics i citològics poden acabar provocant canvis morfològics, visibles macroscòpicament. Alguns canvis fisiològics que es poden estudiar són: l'intercanvi gasós, la taxa de fotosíntesi, el balanç hídric, el funcionament dels estomes, la taxa de transpiració, la permeabilitat cel·lular, les propietats osmòtiques, l'activitat enzimàtica o com, on i quan s'acumulen contaminants en les espècies acumuladores resistents. Quant als canvis citològics, es poden estudiar fenòmens de plasmòlisi, deformació o degeneració de cloroplasts, degeneració de parènquimes, decoloració o canvis de color en la paret cel·lular, etc. Si parlem de canvis morfològics, es pot estudiar, per exemple, l'existència de clorosi o necrosi en fulles, canvis en el creixement, aparició d'individus amb anomalies, etc.

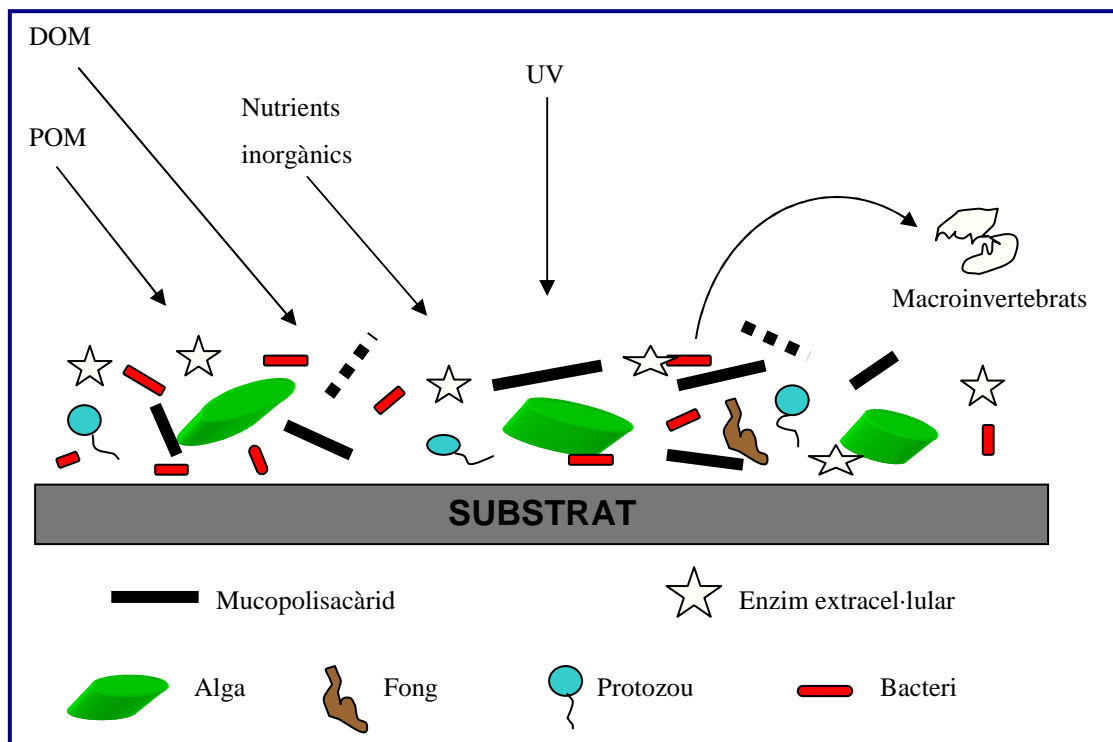
Quan la biomonitorització es fa sobre la població d'una espècie, es poden seguir utilitzant tots els processos o variables anteriors, però també apareix un altre tipus de dades aplicables a una població, com ara: presència/absència, abundància, dominància, àrea o percentatge de cobertura, biomassa, densitat de població, classes d'edat, mortalitat, natalitat, mida de la població, velocitat de creixement i taxa de renovació, etc.

Finalment, quan es biomonitoritza en una comunitat o ecosistema, a tots aquests comentats anteriorment podem afegir-ne altres com: composició específica de la comunitat, estructura de la vegetació, diversitat, freqüència i riquesa específica, existència d'espècies estranyes, les que estan protegides, en perill d'extinció, bioindicadors, cicles de nutrients, flux d'energia, xarxes tròfiques o alimentàries, productivitat, bioacumulació, existència d'impactes ambientals, etc.

Algues i mol·luscs es troben entre els organismes més utilitzats com a organismes bioindicadors. Les macroalgues poden acumular metalls traça, aconseguint concentracions milers de vegades més altes que les corresponents a l'aigua de mar. Les algues només enllacen ions metàl·lics lliures, la concentració dels quals depèn de la naturalesa de les partícules en suspensió. A més, les algues satisfan els requeriments bàsics com a bioindicadors: són sedentàries, són fàcils d'identificar i recollir, estan àmpliament distribuïdes i acumulen metalls en un grau acceptable. Les algues més utilitzades en estudis de biomonitorització al mar Mediterrani són del gènere *Ulva* [I.62].

Entre els mètodes basats en la investigació dels processos dels ecosistemes, destaquen els models per a ecosistemes aquàtics, en els quals disposem d'estudis sobre comunitats de perífiton, centres de sediments i models de microcosmos d'estanys, que en conjunt es consideren com els models de més futur en la valoració dels efectes de les substàncies químiques sobre els ecosistemes, ja que poden reproduir-s'hi fàcilment les condicions naturals perquè són estables, reproduïbles, fàcilment manipulables i amb suficient complexitat biològica [I.60].

El perífiton o biofilm és la biota que creix naturalment en les superfícies que es troben submergides en aigua. Aquest està format per algues, fongs, protozous, bacteris i una matriu polisacàridica que li dóna consistència, tal com podem veure a la **figura I.10**. El biofilm, la base de la cadena tròfica, governa l'assimilació, retenció i transformació de la matèria, tant dissolta com particulada, en sistemes aquàtics. Aquest component serà, per tant, crucial en la resposta a substàncies tòxiques que entrin en el sistema [I.63].



**Figura I.10.** Esquema de l'estructura que presenta el perífiton o biofilm [I.64].

Les principals metodologies que s'utilitzen són: composició i biomassa de biofilm (bacteris, algues, fongs, etc.), metabolisme del biofilm (activitats enzimàtiques extracel·lulars, fotosíntesi, respiració), metabolisme obert (dinàmica de l'oxigen), estructura del biofilm (contingut de C, N i P, polisacàrids, microscòpia electrònica de rastreig...), etc. Estudis del contingut de metall en el biofilm s'estan utilitzant per avaluar la contaminació i la biodisponibilitat de metalls. Aquesta aproximació es basa en el fet que la biodisponibilitat dels metalls afecta la concentració d'aquests sorbida i acumulada en els organismes [I.65].

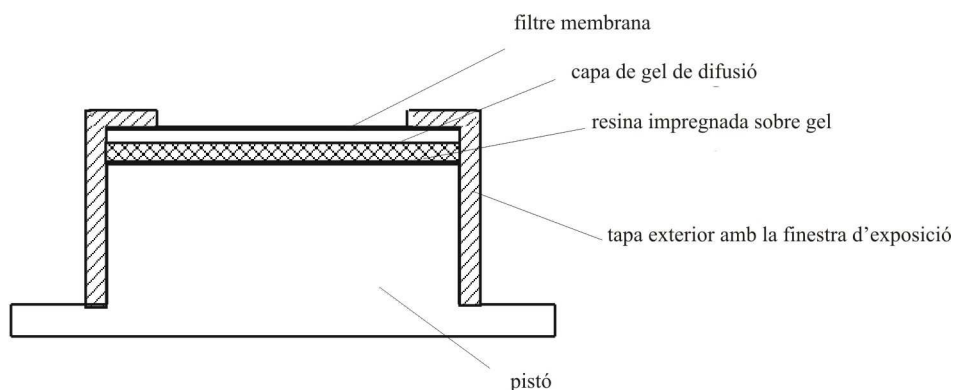
## I.5. ÚS DE LA TÈCNICA '*DIFFUSIVE GRADIENTS IN THIN FILMS*' (DGT) PER AVALUAR LA BIODISPONIBILITAT DELS METALLS

L'especiació metàl·lica, tant física com química, té relació amb la biodisponibilitat i toxicitat dels metalls [I.66]. Segons la seva concentració i grau de complexació, un metall pot limitar el creixement o bé ser tòxic per als organismes presents. Tot i que existeixen mètodes per determinar l'especiació metàl·lica en aigües, aquests solen implicar llargues i laborioses etapes de tractament de mostra i poden, per tant, induir a incertesa i contaminació. Així mateix, sovint necessiten molt de temps o no són exactes a baixes concentracions. Un

d'aquests mètodes és el bescanvi de lligands competitiu, seguit de mesures voltamètriques (CLE-DPASV o CLE-DPCSV), que mostra bons resultats per a aigües i aigües marines. Un mètode recent que permet treballar *in situ* és la tècnica DGT (*diffusive gradients in thin films*), que es pot utilitzar per mesurar metalls en sistemes naturals per exposició del sistema durant uns pocs dies [I.67].

La tècnica DGT va ser desenvolupada a la Universitat de Lancaster el 1993 per Bill Davison i Hao Zhang. És una tècnica simple per mesurar concentracions efectives (espècies lliures i làbils) de metalls en aigua, ja que acumula substàncies dissoltes d'una manera controlada utilitzant una capa de resina quelant (normalment Chelex, amb un grup funcional iminodiacetat) impregnada en un gel que acumula els metalls [I.68]. La capa de resina està coberta per una capa de difusió composta per gel i un filtre, tot muntat sobre un suport de plàstic, tal com es pot veure a la **figura I.11**. Els ions s'han de difondre a través del filtre i de la capa de difusió per arribar a la capa de resina. D'aquesta manera s'estableix un gradient de concentració constant en la capa de difusió, que és la base per poder mesurar les concentracions dels metalls en solució quantitativament sense la necessitat d'un calibratge [I.69].

Quan el dispositiu DGT s'introdueix en aigua permet la mesura de les espècies làbils, és a dir, es mesuren totes les espècies que es puguin enllaçar en la resina. Per exemple, en una aigua natural el Cu es troba present com a espècie inorgànica (com a  $\text{CuOH}^+$  i  $\text{CuCO}_3$ ) i en forma de complexos orgànics que es poden dissociar ràpidament (làbil) o lentament (inert). Amb la tècnica DGT mesurarem totes les espècies inorgàniques i les espècies orgàniques làbils; aquestes són les formes biodisponibles.



**Figura I.11.** Representació esquemàtica del dispositiu DGT.



La mida de porus del gel utilitzat ens permet la difusió d'ions metàl·lics lliures i de complexos inorgànics i orgànics de mida petita, de manera que s'exclouen partícules i col·loides. Perquè els complexos puguin ser mesurats s'han de dissociar durant el seu transport a través de la capa de difusió, per la qual cosa només mesurarem complexos làbils. Això, en alguns casos, inclou els complexos fúlvics, però exclou complexos amb lligands forts com l'EDTA. En resum, amb la tècnica DGT es mesuren espècies dissoltes làbils de mida molecular menor que el porus de l'hidrogel, per la qual cosa, utilitzant gels amb diferents característiques de mida de porus, podem aconseguir diferents discriminacions d'espècies [I.70].

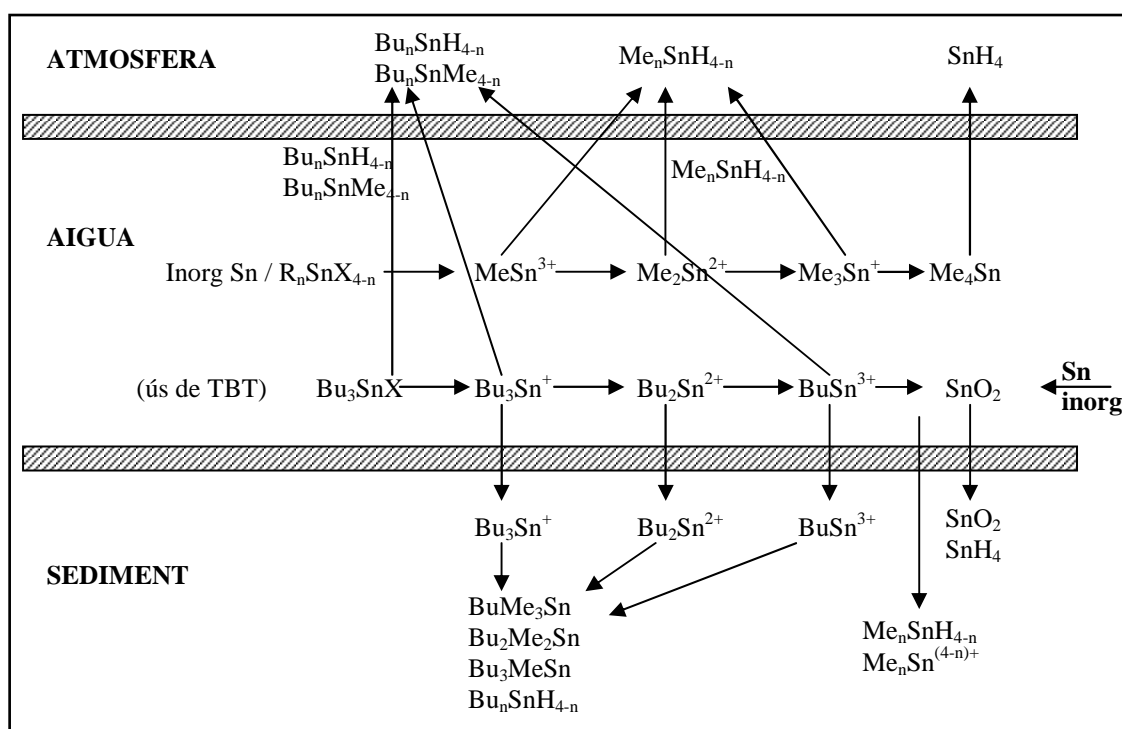
### **I.6. CONTAMINACIÓ PER COMPOSTOS ORGANOESTÀNNICS**

Les propietats dels metalls dissolts a l'aigua depenen en gran manera de la naturalesa de l'espècie de metall dissolta. Per això l'especiació de metalls té un paper molt important en la seva química ambiental. Els metalls poden trobar-se a l'aigua enllaçats amb anions inorgànics o amb compostos orgànics en forma de complexos metàl·lics o com a compostos organometàl·lics, que contenen enllaços carboni-metall. Les solubilitats, propietats de transport i efectes biològics d'aquestes espècies són sovint molt diferents de les dels ions metàl·lics. En el cas dels complexos metàl·lics, la formació de complexos i quelats involucra la unió reversible d'un ió metàl·lic a un lligand. Els compostos organometàl·lics, per altra banda, contenen metalls enllaçats a entitats orgàniques a través d'un àtom de carboni i no es dissocien reversiblement [I.12].

Definim els compostos organometàl·lics com aquells en què un àtom de carboni es troba unit a un àtom metàl·lic per un enllaç sigma polaritzat:  $M^{\delta+}-C^{\delta-}$ . Aquests compostos es poden trobar al medi ambient perquè s'hi formen o perquè hi han estat introduïts. La química d'aquest últim grup és més coneguda i el seu impacte ambiental ha estat àmpliament discutit. Els compostos organometàl·lics poden ser introduïts en el medi a causa del seu ús com a productes amb certes propietats en el medi (per exemple, els biocides) o bé com a additiu d'altres productes amb una funció diferent (per exemple, additius de gasolines o bé estabilitzants de polímers) [I.71].

Els compostos organoestànics són actualment els que s'estudien més intensivament a causa del seu ampli ús i els perillosos efectes ambientals, fins i tot a molt baixa concentració.

S'utilitzen principalment com a catalitzadors per estabilitzar polímers com PVC, com a preservadors de la fusta contra dany fúngic i com a biocides per a aplicacions en agricultura i en pintures marines per prevenir la fixació d'organismes (com algues i mol·luscs) al casc dels vaixells. Les espècies més utilitzades són el tributil estany (TBT), dibutil estany (DBT), trifenil estany (TPhT) i difenil estany (DPhT). Aquests compostos es degraden en el medi en metabòlits més polars, raó per la qual es pot detectar una llarga llista de compostos organoestànics en les mostres ambientals, tal com es pot veure a la **figura I.12** [I.72, I.73].



**Figura I.12.** Cicle biogeoquímic de l'estany.

Fins ara s'ha prestat més atenció al TBT, amb un èmfasi especial sobre la pol·lució en els ecosistemes marins, perquè aquesta espècie és el biocida més emprat en pintures marines. L'entrada de compostos de tributil estany en el medi aquàtic ha comportat un ampli rang d'efectes adversos en diversos grups d'organismes com ara mol·luscs, crustacis, microalgues, bacteris, peixos, mamífers marins, etc. El TBT es troba entre els compostos més tòxics coneguts en ecosistemes aquàtics. L'exposició a TBT a baixes concentracions (a nivells de  $ng\ L^{-1}$ ) en organismes aquàtics pot causar respostes no letals, com la reducció del creixement, el desenvolupament de closques més fines o bé un desenvolupament sexual anormal (com el

desenvolupament de característiques masculines en femelles) [I.72, I.74, I.75]. Encara que el TBT és sovint l'espècie més tòxica dels butilats d'estany, el monobutil estany (MBT) mostra per a alguns microorganismes aquàtics una toxicitat comparable o fins i tot, en alguns casos, superior. Per tant, la desbutilació en els organismes via: TBT > DBT > MBT > Sn no redueix la toxicitat per a tots els organismes. A més, també s'han trobat evidències d'una entrada directa al medi de MBT i DBT degudes, per exemple, a lixiviats de material de PVC. Aquests compostos presenten una solubilitat en aigua més elevada que les corresponents espècies trialquilades, cosa que probablement fa que augmenti la contaminació de l'aigua natural i subterrània [I.76, I.77].

El 1989 la Unió Europea va publicar la Directiva 89/677/CEE, per la qual es prohibeix l'ús de TBT per a vaixells de menys de 25 metres d'eslora i per a qualsevol element que se submergeixi (com xarxes), i el seu ús es limita als professionals. El 1990, el Marine Environment Protection Committee (MEPC) de la International Maritime Organization (IMO) va adoptar una resolució que recomanava la prohibició de l'ús de TBT en aquestes embarcacions petites (Resolution MEPC 46 (30), MEPC, 1990). Més recentment, la convenció de l'IMO del 2001, International Convention on the Control of Harmful Antifouling Systems on Ships, prohibia l'aplicació d'aquest tipus de pintures des de l'1 de gener de 2003 i la presència d'organoestànics al casc de vaixells a partir de l'1 de gener de 2008 (MEPC, 2001) [I.78- I.80]. La Directiva 2002/62/EC modifica l'anterior (76/769/EEC) i prohibeix l'ús de compostos organoestànics en qualsevol formulació comercial. Molts països han posat restriccions a l'ús de TBT en pintures marines per a embarcacions de menys de 25 metres a causa dels seus efectes ambientals. Malgrat això, aquestes regulacions no existeixen en la majoria de països asiàtics, on, a més a més, es troba la indústria de construcció naval més gran del món [I.81].

Com a conseqüència, el TBT s'ha inclòs en les llistes de la USEPA Environmental Endocrine Disrupters i en la de la European Union Priority Pollutants [I.82]. Per això es necessiten mètodes prou sensibles, selectius i exactes per a una determinació acurada i simultània dels compostos organoestànics a baixes concentracions en diferents mostres ambientals de manera rutinària [I.83- I.85].

L'estany, en la seva forma inorgànica, es considera una espècie no tòxica, però el comportament toxicològic dels organoestànics és molt complex. Els efectes d'aquestes

substàncies depenen de la llargada i del nombre de grups orgànics enllaçats a l'àtom d'estany. La toxicitat dels organoestànics creix amb la progressiva introducció de grups orgànics en l'àtom d'estany (la toxicitat màxima es troba per a les espècies trialquilades) i decreix en augmentar la llargada de les cadenes alquíliques (les espècies amb cadenes llargues essencialment no són tòxiques en els organismes) [I.76, I.86, I.87]. Aquesta dependència de la toxicitat en l'estructura química del compost fa que l'especiació sigui tan important. L'elucidació dels efectes biològics i dels impactes ambientals de les espècies d'estany no es pot aconseguir mitjançant les anàlisis convencionals d'estany total, sinó que requereix tècniques analítiques que permetin tant la identificació com la determinació quantitativa de les diferents espècies inorgàniques i alquilades d'estany [I.86, I.88].

L'especiació se sol realitzar mitjançant tècniques acoblades basades en la combinació d'una tècnica de separació cromatogràfica (com la cromatografia de gasos) i un sistema de detecció específic, com pot ser l'espectroscòpia d'absorció atòmica (AAS) [I.89], el detector fotomètric de flama (FPD) [I.80, I.87, I.90, I.91] o l'espectrometria de masses (MS o ICP-MS) [I.92- I.94]. Per a l'anàlisi per cromatografia de gasos, les espècies organoestàniques s'han d'extreure de la matriu de la mostra i transformar-les en la seva forma completament alquilada, que és més volàtil i, per tant, pot ser separada per aquest sistema analític. El tetraetilborat de sodi ( $\text{NaBEt}_4$ ) ha esdevingut un agent derivatitzant molt popular els últims anys, ja que permet una preparació de la mostra més ràpida i fàcil, és a dir, permet la derivatització *in situ*, seguida de l'extracció dels compostos derivatitzats en hexà per a la seva anàlisi posterior [I.76, I.91, I.95].

A la bibliografia es troben un gran nombre de mètodes d'extracció de matrius biològiques per als compostos organoestànics. Generalment es basen en solvents orgànics i barreges d'àcids, a vegades amb l'ajuda d'agents complexants [I.96, I.97]. Altres mètodes proposen la hidròlisi amb hidròxid de tetrametilamoni (TMAH) o la digestió enzimàtica amb proteasa o lipasa. No obstant això, aquests mètodes requereixen un temps llarg de tractament de la mostra i, en alguns casos, es troben baixes recuperacions, especialment per al MBT a causa de les seves fortes interaccions amb la matriu. En aquest context, els ultrasons apareixen com una opció interessant pel seu potencial per accelerar reaccions químiques mitjançant els seus efectes de cavitació. L'aplicació d'ultrasons mitjançant una sonda en l'etapa d'extracció dels compostos de la matriu de la mostra es proposa com una alternativa a altres tècniques com l'extracció àcida, l'extracció per fluid supercrític (SFE) o l'extracció

assistida per microones, tècniques molt llargues i amb les quals sovint s'obtenen baixes recuperacions [I.88, I.98, I.99].

Cada etapa analítica necessària en aquestes determinacions (extracció, derivatització, separació i detecció) pot afectar la precisió i exactitud dels resultats finals. Per aquesta raó es desenvolupen les metodologies de dilució isotòpica, amb les quals podem obtenir millors resultats perquè la quantificació es realitza per relacions isotòpiques. Un cop s'ha arribat a l'equilibri isotòpic després de l'addició del patró enriquit en un isòtop determinat, no ens afectarà qualsevol procés no quantitatiu, ja que la relació isotòpica no variarà [I.79, I.100-I.102].

---

## I.7. REFERÈNCIES

- I.1- ALBERT LA (1999) *Curso básico de toxicología ambiental* (2a ed.) Mèxic: Editorial Limusa
- I.2- OROZCO BARRENETXEA C et al. (2003) *Contaminación ambiental: Una visión desde la química* (1a ed.) Madrid: Thomson editores
- I.3- GARCÍA GUINEA J, MARTÍNEZ FRÍAS J (coord.) (1992) *Recursos minerales de España* (1a ed.) Madrid: Consejo superior de investigaciones científicas
- I.4- DÍAZ DEL RÍO V (1993) *Estudio geoambiental del Mar Menor* (1a ed.) Madrid: Instituto Español de Oceanografía
- I.5- GARCÍA GARCÍA C (2004) *Impacto y riesgo ambiental de los residuos mineros metalúrgicos de la Sierra de Cartagena-La Unión (Murcia-España)* (Tesi Doctoral) Universidad Politécnica de Cartagena
- I.6- ESTEVE SELMA MA, LORÉNS PASCUAL DEL RIQUELME M, MARTÍNEZ GALLUR C (Eds.) (2003) *Los recursos naturales de la región de Murcia* (1ª ed.) Murcia: Universidad de Murcia
- I.7- MARÍN-GUIRAO L et al. (2005) Effects of mining wastes on a seagrass ecosystem: metal accumulation and bioavailability, seagrass dynamics and associated community structure. *Mar Environ Res* 60:317-337
- I.8- ROBLES-ARENAS VM (2007) *Caracterización hidrogeológica de la Sierra de Cartagena-La Unión (SE de la Península Ibérica). Impacto de la minería abandonada sobre el medio hídrico* (Tesi Doctoral) Univesitat Politècnica de Catalunya
- I.9- SIMONNEAU J (1973) *MAR MENOR: evolution sedimentologique et geochimique recente du remplissage* (Tesi Doctoral) Université Paul Sabatier de Toulouse
- I.10- <http://www.tinet.org/mediterranea/html/castella/ecologia/ecolprof.htm> (14/12/07)
- I.11- BAUTISTA C (1998) *Residuos: guía técnico-jurídica* (1a ed.) Madrid: Mundi-Prensa
- I.12- MANAHAN SE (2007) *Introducción a la química ambiental* (1a ed.) Barcelona: Editorial Reverté
- I.13- LAGREGA MD, BUCKINGHAM PL, EVANS JC (1994) *Hazardous waste management* (1a ed.) New York: McGraw-Hill
- I.14- ISKANDAR IK, KIRKHAM MB (Eds.) (2001) *Trace elements in soil: bioavailability, flux, and transfer* (1a ed.) Boca Raton: Lewis

- I.15- ÁLVAREZ E et al. (2003) Heavy metals in the dump of an abandoned mine in Galicia (NW Spain) and in the spontaneously occurring vegetation. *Sci Total Environ* 313:185-197
- I.16- PASSARIELLO B et al. (2002) Evaluation of the environmental contamination at an abandoned mining site. *Microchem J* 73:245-250
- I.17- KOT A, NAMIESŃIK J (2000) The role of speciation in analytical chemistry. *Trac-Trends Anal Chem* 19:69-79
- I.18- QUEVAUVILLER P (1998) Operationally defined extraction procedures for soil and sediment analysis. I. Standardization. *Trac-Trends Anal Chem* 17:289-298
- I.19- QUEVAUVILLER P, RAURET G, GRIEPINK B (1993) Single and sequential extraction in sediments and soils. *Int J Environ Anal Chem* 51:231-235
- I.20- SCHWEDT G (2001) *The essential guide to environmental Chemistry* (1a ed.) West Sussex: John Wiley & Sons
- I.21- RAURET G (1998) Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment. *Talanta* 46:449-455
- I.22- SAHUQUILLO A, RIGOL A, RAURET G (2003) Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *Trac-Trends Anal Chem* 22:152-159
- I.23- VAN DER SLOOT HA, COMANS RNJ, HJELMAR O (1996) Similarities in the leaching behaviour of trace contaminants from waste, stabilized waste, construction materials and soils. *Sci Total Environ* 178:111-126
- I.24- HAGE JLT, MULDER E (2004) Preliminary assessment of three new European leaching tests. *Waste Management* 24:165-172
- I.25- SVETE P, MILAČIĆ R, PIHLAR B (2001) Partitioning of Zn, Pb and Cd in river sediments from a lead and zinc mining area using the BCR three-step sequential extraction procedure. *J Environ Monit* 3:586-590
- I.26- ŠČANČAR J et al. (2000) Total metal concentrations and partitioning of Cd, Cr, Cu, Fe, Ni and Zn in sewage sludge. *Sci Total Environ* 250:9-19
- I.27- GALÁN E et al. (2003) Heavy metal partitioning in river sediments severely polluted by acid mine drainage in the Iberian Pyrite Belt. *Appl Geochem* 18:409-421
- I.28- DAS AK et al. (1995) Metal speciation in solid matrices. *Talanta* 42:1007-1030

- 
- I.29- TESSIER A, CAMPBELL PGC, BISSON M (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal Chem* 51:844-851
- I.30- MATHEW M et al. (2003) Speciation of heavy metals in bed sediments of wetlands in urban Coimbatore, India. *Bull Environ Contam Toxicol* 70:800-808
- I.31- DOLLAR NL et al. (2001) Chemical fractionation of metals in wetland sediments: Indiana dunes national lakeshore. *Environ Sci Technol* 35:3608-3615
- I.32- RAURET G, RUBIO R, LOPEZ-SANCHEZ JF (1989) Optimization of Tessier procedure for metal solid speciation in river-sediments. *Int J Environ Anal Chem* 36:69-83
- I.33- BELAZI AU et al. (1995) Determination and speciation of heavy metals in sediments from the Cumbrian Coast, NW England, UK. *J Anal At Spectrom* 10:233-240
- I.34- BOSTICK BC et al. (2001) Seasonal fluctuations in Zinc speciation within a contaminated wetland. *Environ Sci Technol* 35:3823-3829
- I.35- BRANDVOLD LA et al. (1995) Distribution and partitioning of Copper, Lead and Zinc in stream sediments above and below an abandoned mining and milling area near Pecos, New Mexico, USA. *Analyst* 120:1485-1495
- I.36- KEON NE et al. (2001) Validation of an Arsenic sequential extraction method for evaluating mobility in sediments. *Environ Sci Technol* 35:2778-2784
- I.37- FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ R et al. (2005) Distribution and mobility of mercury in soils from an old mining area in Mieres, Asturias (Spain). *Sci Total Environ* 346:200-212
- I.38- MARIN B et al. (1997) Reproducibility testing of a sequential extraction scheme for the determination of trace metal speciation in a marine reference sediment by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 342:91-112
- I.39- SAHUQUILLO A et al. (1999) Use of a certified reference material for extractable trace metals to assess sources of uncertainty in the BCR three-stage sequential extraction procedure. *Anal Chim Acta* 382:317-327
- I.40- MOSSOP KF, DAVIDSON CM (2003) Comparison of original and modified BCR sequential extraction procedures for the fractionation of copper, iron, lead, manganese and zinc in soils and sediments. *Anal Chim Acta* 478:111-118
- I.41- DE BARTOLOMEO A et al. (2004) Relationship among parameters of lake polluted sediments evaluated by multivariate statistical analysis. *Chemosphere* 55:1323-1329



- I.42- MUCHA AP et al. (2004) Vertical distribution of the macrobenthic community and its relationships to trace metals and natural sediment characteristics in the lower Douro estuary, Portugal. *Estuar Coast Shelf Sci* 59:663-673
- I.43- SAULNIER I, MUCCI A (2000) Trace metal remobilization following the resuspension of estuarine sediments: Saguenay Fjord, Canada. *Appl Geochem* 15:203-222
- I.44- YU KC et al. (2001) Chemical binding of heavy metals in anoxic river sediments. *Wat Res* 35:4086-4094
- I.45- CORREIA AD, COSTA MH (2000) Effects of sediment geochemical properties on the toxicity of copper-spiked sediments to the marine amphipod *Gammarus locusta*. *Sci Total Environ* 247:99-106
- I.46- MACKAY AP, MACKAY S (1996) Spatial distribution of acid-volatile sulphide concentration and metal bioavailability in mangrove sediments from the Brisbane river, Australia. *Environ Pollut* 93:205-209
- I.47- RICKARD D, MORSE JW (2005) Acid volatile sulfide (AVS). *Mar Chem* 97:141-197
- I.48- VAN DEN HOOP MAGT, DEN HOLLANDER HA, KERDIJK HN (1997) Spatial and seasonal variations of acid volatile sulphide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) in Dutch marine and freshwater sediments. *Chemosphere* 35:2307-2316
- I.49- DAVIS A, ATKINS D (2001) Metal distribution in Clark Fork river sediments. *Environ Sci Technol* 35:3501-3506
- I.50- FIEDLER HD et al. (1999) Acid volatile sulfide determination in sediments using elemental analyzer with thermal conductivity detector. *Talanta* 48:403-407
- I.51- SUITS NS, ARTHUR MA (2000) Sulfur diagenesis and partitioning in Holocene Peru shelf and upper slope sediments. *Chem Geol* 163:219-234
- I.52- ALLEN HE, et al. (1991) United States Environmental Protection Agency Report 821-R-91-100, Washington, DC
- I.53- EL BILALI L et al. (2002) Role of sediment composition in trace metal distribution in lake sediments. *Appl Geochem* 17:1171-1181
- I.54- LASORSA B, CASAS A (1996) A comparison of sample handling and analytical methods for determination of acid volatile sulfides in sediment. *Mar Chem* 52:211-220
- I.55- FANG T, LI X, ZHANG G (2005) Acid volatile sulfide and simultaneously extracted metals in the sediment cores of the Pearl River Estuary, South China. *Ecotox Environ Safe* 61:420-431

- 
- I.56- WEN X, ALLEN HE (1999) Mobilization of heavy metals from Le An River sediment. *Sci Total Environ* 227:101-108
- I.57- SANCHIZ C, GARCÍA-CARRASCOSA AM, PASTOR A (2001) Relationships between sediment physico-chemical characteristics and heavy metal bioaccumulation in Mediterranean soft-bottom macrophytes. *Aquat Bot* 69:63-73
- I.58- CAMPANELLA L et al. (2001) Trace metals in seagrass, algae and molluscs from an uncontaminated area in the Mediterranean. *Environ Pollut* 111:117-126
- I.59- RAINBOW PS (1995) Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Mar Pollut Bull* 31:183-192
- I.60- CAPÓ MARTÍ M (2002) *PRINCIPIOS DE ECOTOXICOLOGÍA: diagnóstico, tratamiento y gestión del medio ambiente* (1a ed.) Madrid: Mc Graw-Hill Interamericana
- I.61- ACETO M et al. (2003) The use of mosses as environmental metal pollution indicators. *Chemosphere* 50:333-342
- I.62- CONTI ME, CECCHETTI G (2003) A biomonitoring study: trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal areas. *Environ Res* 93:99-112
- I.63- GUASCH H, ADMIRAAL W, SABATER S (2003) Contrasting effects of organic and inorganic toxicants on freshwater periphyton. *Aquat Toxicol* 64:165-175
- I.64- <http://ciencias.udg.es/iea/LIMNORIVERS.htm> (14/12/07)
- I.65- BEHRA R et al. (2002) Copper and zinc content of periphyton from two rivers as a function of dissolved metal concentration. *Aquat Sci* 64:300-306
- I.66- HUANG S, WANG Z (2003) Application of anodic stripping voltammetry to predict the bioavailable/toxic concentration of Cu in natural water. *Appl Geochem* 18:1215-1223
- I.67- MEYLAN S et al. (2004) Speciation of copper and zinc in natural freshwater: comparison of voltammetric measurements, diffusive gradients in thin films (DGT) and chemical equilibrium models. *Anal Chim Acta* 510:91-100
- I.68- TUSSEAU-VUILLEMIN MH et al. (2004) Performance of diffusion gradient in thin films to evaluate the toxic fraction of copper to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 23:2154-2161
- I.69- ZHANG H, DAVISON W (1995) Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the in situ measurements of trace metals in aqueous solution. *Anal Chem* 67:3391-3400

- I.70- GIMPEL J et al. (2001) Effect of solution composition, flow and deployment time on the measurement of trace metals by the diffusive gradient in thin films technique. *Anal Chim Acta* 448:93-103
- I.71- HIRNER AV, EMONS H (Eds.) (2004) *Organic metal and metalloid species in the environment* (1a ed.) Berlin: Springer-Verlag
- I.72- DEVOS C et al. (2005) Automated headspace-solid-phase micro extraction-retention time locked-isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of organotin compounds in water and sediment samples. *J Chromatogr A* 1079:408-414
- I.73- BURTON ED, PHILLIPS IR, HAWKER DW (2005) In-situ partitioning of butyltin compounds in estuarine sediments. *Chemosphere* 59:585-592
- I.74- GÓMEZ-ARIZA JL, MORALES E, GIRÁLDEZ I (1999) Uptake and elimination of tributyltin in clams, *Venerupis decussata*. *Mar Environ Res* 47:399-413
- I.75- TAO H et al. (1999) Tin speciation in the femtogram range in open ocean seawater by gas chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry using a shield torch at normal plasma conditions. *Anal Chem* 71:4208-4215
- I.76- HOCH M (2001) Organotin compounds in the environment - an overview. *Appl Geochem* 16:719-743
- I.77- RÜDEL H (2003) Case study: bioavailability of tin and tin compounds. *Ecotox Environ Safe* 56:180-189
- I.78- ARIESE F et al. (1999) Evaluation of the state-of-the-art of butyl- and phenyltin compound determinations in freshwater sediment prior to certification of a reference material. *J Environ Monit* 1:191-196
- I.79- GARCÍA ALONSO JI et al. (2002) Determination of butyltin compounds in environmental samples by isotope-dilution GC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 373:432-440
- I.80- GÓMEZ-ARIZA JL et al. (2006) Organotin contamination in the Atlantic Ocean off the Iberian Peninsula in relation to shipping. *Chemosphere* 64:1100-1108
- I.81- SHIM WJ et al. (2005) Accumulation of butyl- and phenyltin compounds in starfish and bivalves from the coastal environment of Korea. *Environ Pollut* 133:489-499
- I.82- DÍEZ S, ÁBALOS M, BAYONA JM (2002) Organotin contamination in sediments from the Western Mediterranean enclosures following 10 years of TBT regulation. *Wat Res* 36:905-918

- 
- I.83- CENTINEO G et al. (2006) Isotope dilution GC-MS routine method for the determination of butyltin compounds in water. *Anal Bioanal Chem* 384:908-914
- I.84- ÜVEGES M et al. (2007) Isotope dilution analysis mass spectrometry for the routine measurement of butyltin compounds in marine environmental and biological samples. *Microchem J* 85:115-121
- I.85- QUEVAUVILLER P et al. (2000) Collaborative evaluation of methods for tributyltin determinations in sediment and mussel tissue. *Trac-Trends Anal Chem* 19:180-188
- I.86- GUI-BIN J, QUN-FANG Z, BIN H (2000) Speciation of organotin compounds, total tin, and major trace metal elements in poisoned human organs by gas chromatography-flame photometric detector and inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 34:2697-2702
- I.87- GÓMEZ-ARIZA JL et al. (2002) Determination of methyltin species in sediments using a pervaporation-gas chromatographic approach. *Appl Organometal Chem* 16:210-215
- I.88- CAMPILLO N et al. (2004) Speciation of organotin compounds in waters and marine sediments using purge-and-trap capillary gas chromatography with atomic emission detection. *Anal Chim Acta* 525:273-280
- I.89- THOMAIDIS NS, ADAMS FC, LEKKAS TD (2001) A simple method for the speciation of organotin compounds in water samples using ethylation and GC-QFAAS. *Microchim Acta* 136:137-141
- I.90- CARLIER-PINASSEAU C, LESPE G, ASTRUC M (1997) Determination of butyl- and phenyltin compounds in sediments by GC-FPD after NaBEt<sub>4</sub> ethylation. *Talanta* 44:1163-1171
- I.91- CASSI R et al. (2002) Organotin speciation analyses in marine biota using sodium tetraethylborate ethylation and gas chromatography with flame photometric detection. *Appl Organometal Chem* 16:355-359
- I.92- BIANCHI F et al. (2006) Optimization of the solid phase microextraction procedure for the ultra-trace determination of organotin compounds by gas chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J Anal At Spectrom* 21:970-973
- I.93- RUIZ ENCINAR J et al. (2002) Evaluation of extraction techniques for the determination of butyltin compounds in sediments using isotope dilution-GC/ICPMS with <sup>118</sup>Sn and <sup>119</sup>Sn-enriched species. *Anal Chem* 74:270-281
- I.94- DÍAZ J et al. (2007) Distribution of butyltin and derivatives in oyster shells and trapped sediments of two estuaries in Cantabria (Northern Spain). *Chemosphere* 67:623-629

- I.95- MORABITO R, MASSANISSO P, QUEVAUVILLER P (2000) Derivatization methods for the determination of organotin compounds in environmental samples. *Trac-Trends Anal Chem* 19:113-119
- I.96- PELLEGRINO C, MASSANISSO P, MORABITO R (2000) Comparison of twelve selected extraction methods for the determination of butyl- and phenyltin compounds in mussel samples. *Trac-Trends Anal Chem* 19:97-106
- I.97- GÓMEZ-ARIZA JL et al. (2001) Sample treatment in chromatography-based speciation of organometallic pollutants. *J Chromatogr A* 938:211-224
- I.98- SANZ E, MUÑOZ-OLIVAS R, CÁMARA C (2005) Evaluation of a focused sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples. *J Chromatogr A* 1097:1-8
- I.99- GALLEGO-GALLEGOS M et al. (2006) Focused ultrasound and molecularly imprinted polymers: A new approach to organotin analysis in environmental samples. *J Chromatogr A* 1114:82-88
- I.100- CENTINEO G et al. (2004) Simultaneous determination of mono-, di- and tributyltin in environmental samples using isotope dilution gas chromatography mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 39:485-494
- I.101- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ P et al. (2005) Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review. *Spectrosc Acta Pt B* 60:151-207
- I.102- HILL SJ, PITTS LJ, FISHER AS (2000) High-performance liquid chromatography-isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry for speciation studies: an overview. *Trac-Trends Anal Chem* 19:120-12



## **OBJECTIUS**



L'objectiu general d'aquesta tesi és l'estudi, mitjançant diferents aproximacions, de la problemàtica ambiental existent al mar Menor i la Sierra de Cartagena degut a activitats antropogèniques que s'hi desenvolupen i s'hi han desenvolupat al llarg de la història.

De forma més específica, els treballs que componen la present memòria persegueixen els objectius següents:

- Caracteritzar la contaminació per metalls present en els sediments del mar Menor, originada per activitats mineres ja abandonades, mitjançant esquemes d'extracció seqüencial i la relació entre els paràmetres SEM i AVS. Avaluar diferents esquemes d'extracció seqüencial i comparar la informació proporcionada per aquests procediments.
- Caracteritzar la contaminació per metalls en els residus miners acumulats a la Sierra de Cartagena, mitjançant l'aplicació de l'esquema d'extracció seqüencial BCR i el test de lixiviació DIN. Fent ús de tècniques d'anàlisi multivariant, avaluar l'estructura dels resultats de l'aplicació de l'esquema d'extracció seqüencial sobre diferents mostres i estudiar possibles relacions entre elles i amb els sediments del mar Menor.
- Avaluar els possibles efectes perjudicials de l'elevada contaminació metàl·lica trobada a la zona mitjançant diferents aproximacions: l'ús d'organismes per a investigar la bioacumulació dels metalls, realitzant experiments tant al laboratori com al camp, i l'ús de la tècnica '*diffusive gradients in thin films*' (DGT) per a mesurar el metall biodisponible a l'aigua del mar Menor.
- Estudiar la contaminació provinent d'altres activitats antropogèniques avaluant les espècies organoestàniques presents en peixos i bivalves. Desenvolupar la metodologia adient per a determinar de manera fàcil i ràpida les diferents espècies de butilats d'estany en els organismes marins.







# **CAPÍTOL 1**

**Caracterització de la  
contaminació per metalls en els  
sediments del mar Menor**



## 1.1. INTRODUCCIÓ

L'home ha esdevingut el factor més important en l'alteració de la biogeoquímica global dels metalls. Les aportacions antropogèniques de metalls als ecosistemes a través de l'aire, l'aigua i els sòls han augmentat substancialment arreu del món l'últim segle. Els ions de metalls com Cu, Zn, Mn, Fe i Ni són micronutrients essencials per al metabolisme de molts organismes, però quan hi són presents en excés, aquests, i els metalls no essencials com Cd i Pb, poden tornar-se extremament tòxics. El perjudici d'aquests metalls s'incrementa com a resultat de la bioacumulació, per la capacitat de molts organismes vius d'actuar com a eficients interceptors i acumuladors de substàncies químiques [1.1].

Els sediments són fonts i reservoris importants de matèria inorgànica i orgànica en rius, embassaments d'aigua dolça, estuaris i oceans. És incorrecte considerar els sediments simplement com a sòl humit. Els sòls normalment es troben en contacte amb l'oxigen de l'atmosfera i són "òxics", mentre que l'ambient al voltant dels sediments és normalment "anòxic" i, per tant, els sediments es troben sotmesos a condicions reductores [1.2]. Els sediments estan sotmesos a lixiviacions contínues, a diferència dels sòls. D'altra banda, el nivell de matèria orgànica en els sediments és generalment més elevat que en els sòls. Els sediments són dipòsits d'una gran varietat de deixalles biològiques, químiques i contaminants en els cossos o reservoris d'aigua, i són albellons de contaminants com metalls i compostos orgànics tòxics. És particularment preocupant la transferència d'espècies químiques dels sediments a les xarxes alimentàries aquàtiques via organismes, com ara cucs o cloïsses, que passen una part important dels seus cicles de vida en contacte amb el sediment [1.3, 1.4].

Els sediments consisteixen en diferents fases geoquímiques com carbonats, òxids de Fe i Mn, matèria orgànica i argiles. Aquests components diversos que constitueixen la matriu del sediment normalment no existeixen com a partícules separades, sinó com a agregats, i actuen com a reservoris de metalls traça en el medi. Els metalls poden estar sorbits a la superfície de les partícules, oclusos en el material amorf o estar presents en l'estructura dels minerals, cada forma exhibint diferents propietats químiques [1.5]. Els ions metàl·lics solubles, com  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ , poden enllaçar-se amb els òxids metàl·lics, com  $\text{MnO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ , per adsorció d'intercanvi iònic no específic o per formació de complexos amb grups superficials  $-\text{OH}$ , coprecipitació com a dissolució sòlida amb l'òxid metàl·lic o com a òxid o hidròxid discret o separat del material sorbit. Alguns òxids

metàl·lics hidratats, com són l'òxid de manganès (IV) i l'òxid de ferro (III), són especialment eficients en l'adsorció de diverses espècies de les dissolucions aquàtiques [1.3]. En sòls o sediments no contaminats, els metalls traça estan principalment units a silicats o minerals primaris, i formen espècies relativament immòbils, mentre que, en els contaminats, els metalls traça estan generalment en formes més mòbils i units a altres fases del sòl o sediment [1.6].

Hi ha dues espècies inorgàniques particularment importants en el “segrest” o retenció de metalls en els sediments. Una d'aquestes espècies és l'òxid hidratat de ferro (III), que normalment es representa per  $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot x(\text{H}_2\text{O})$ ,  $\text{Fe}(\text{OH})_3$  o  $\text{FeOOH}$ , amb el qual coprecipiten altres metalls. Aquest material es forma quan el ferro (II) soluble s'exposa a condicions oxidants. Sota condicions anòxiques el material es redueix a ferro (II) soluble, el qual allibera els metalls enllaçats. El segon compost important que enllaça els metalls està representat pels sulfurs àcids volàtils, especialment el  $\text{FeS}$ . La majoria dels metalls tenen major afinitat per l'ió sulfur que pel ferro (II), de manera que tendeixen a desplaçar el  $\text{Fe}$  (II) d'aquest compost. Les condicions que afavoreixen la reducció de l'òxid de ferro (III) hidratat, i que porten a alliberar els ions de metalls segrestats, també afavoreixen la formació de  $\text{FeS}$ , que pot alliberar el sulfur per enllaçar aquests ions i donar compostos insolubles.

Les toxicitats dels metalls en els sediments i la seva disponibilitat als organismes són molt importants per determinar els seus efectes ambientals en els sistemes aquàtics. En condicions òxiques, la disponibilitat dels metalls es relaciona amb els mecanismes d'enllaç al carboni orgànic i als òxids i hidròxids de  $\text{Fe}$  i  $\text{Mn}$ . Molts sediments són anòxics, de manera que la reducció microbiana de sulfat a sulfur ocasiona la preponderància dels sulfurs metàl·lics en aquests sediments, de manera que la disponibilitat dels metalls bivalents es relaciona amb els AVS, ja que les solubilitats tan baixes dels sulfurs tendeixen a limitar-la [1.7]. Tot i així, l'exposició d'aquests sediments a l'aire i la consegüent oxidació de sulfurs a sulfat pot alliberar quantitats significatives de metalls. Les operacions de dragatge poden exposar els sediments anòxics a l'aire i ocasionar així l'oxidació dels sulfurs i l'alliberament de metalls com plom, mercuri, cadmi, zinc i coure [1.3, 1.8].

Per avaluar l'impacte mediambiental real a curt i llarg termini d'un element traça, un dels factors més importants que cal considerar és la seva mobilitat [1.9]. Com que la mobilitat determina el seu transport a sistemes hidrofòbics i la transferència a corrents d'aigua, els metalls poden passar a plantes i animals o al medi hídric. Alguns estudis han

---

suggerit una correlació entre les fraccions mòbil i disponible dels metalls, però aquesta relació requereix confirmació per a diferents metalls. La complexitat de les reaccions i les transformacions dels metalls en el sòl o els sediments fan difícil predir la disponibilitat, la mobilitat i la retenció del metall. Per avaluar la contaminació correctament, la quantitat de metall total s'ha de subdividir en les seves diferents formes químiques, per poder treure conclusions com quins metalls poden entrar més fàcilment en el cicle biològic i quins es troben més fortament enllaçats i, per tant, és menys probable que es mobilitzin [1.10, 1.11].

Per a la caracterització de la contaminació per metalls d'un sediment o sòl es poden seguir diferents aproximacions. La determinació del metall total en les mostres de sòls, sediments o residus és útil per avaluar-ne la càrrega de metall present, però la mobilitat i la disponibilitat d'aquest metall depenen en gran mesura de les formes químiques presents o de la manera com es troba enllaçat al substrat. No obstant això, la determinació de les formes químiques específiques és difícil, i sovint impossible. Per aquesta raó, els procediments d'extracció seqüencial són aplicats habitualment, ja que proporcionen informació sobre el fraccionament dels metalls en la mostra, que és un bon compromís per donar informació sobre el risc de contaminació ambiental [1.6, 1.12].

L'esquema d'extracció seqüencial més utilitzat és el proposat per Tessier et al. [1.13] o modificacions d'aquest. Utilitzant aquest procediment, s'obtenen les fraccions següents: intercanviables (metalls que poden ser alliberats per un simple augment de la força iònica del medi), sensibles a canvis de pH (units a carbonats), inestables sota condicions reductives (units a òxids de Fe-Mn), aquells que s'extreuen en degradar la matèria orgànica sota condicions oxidants (units a matèria orgànica) i fracció residual [1.14].

Trobem molts esquemes d'extracció seqüencial en la bibliografia, però aquests mètodes presenten sovint falta de selectivitat dels extractants i de redistribució entre fases durant l'extracció. Tot i que hi ha, en general, un acord sobre el tipus d'extractant necessari per a cada etapa, existeixen diferències en les especificacions analítiques en detall, la qual cosa fa que sigui extremament difícil comparar resultats de diferents estudis [1.10].

Per harmonitzar els diferents esquemes d'extracció seqüencial, l'Standard Measurement and Testing Programme (SM&T, inicialment BCR) va proposar un procediment d'extracció en tres etapes que pren en consideració la quantitat d'informació obtinguda i el temps d'anàlisi [1.15]. Aquest esquema d'extracció en tres etapes es basa en

una extracció amb àcid acètic 0,11 M (etapa 1: fracció intercanviable i soluble en àcid), seguida d'una extracció amb clorur d'hidroxilamina 0,1 M a pH 2 (etapa 2: fracció reduïble), i finalment una digestió de la matèria orgànica amb peròxid d'hidrogen 30 % i extracció amb acetat d'amoni 1 M a pH 2 (etapa 3: fracció oxidable). L'avantatge d'aquest esquema és que tenim disponibles materials de referència amb valors certificats i indicatius de les concentracions de diferents elements en cada etapa d'extracció [1.11]. Alguns estudis reporten dificultats en l'aplicació d'aquest esquema, com falta de selectivitat, redistribució dels anàlits entre fases i variabilitat entre operadors, la qual cosa s'atribueix a petites variacions en el pH de la solució de clorur d'hidroxilamina [1.16]. Sahuquillo et al. [1.17] troben en el seu estudi que, per millorar la reproductibilitat del procediment, s'ha d'augmentar la concentració d'extractant a 0,5 M i el pH s'ha de fixar en 1,5. Proposen addicionar un volum fix de  $\text{HNO}_3$  diluït per evitar possibles errors causats pel mal calibratge del pH-metre. També estudien l'efecte del tipus d'àcid utilitzat en l'ajust del pH; el HCl provoca la formació de complexos, per això es prefereix  $\text{HNO}_3$ . Mossop i Davidson [1.18] comparen l'esquema BCR modificat amb l'original i troben que l'esquema modificat permet extreure més Fe en la segona etapa que en la corresponent de l'esquema original per a diferents substrats, i suggereixen que l'esquema modificat pot permetre un millor atac dels components reduïbles basats en ferro de la matriu. No troben millores en la precisió del mètode, tot i que creuen convenient realitzar estudis interlaboratori. També es va introduir una quarta etapa (extracció en aigua règia), de manera que el metall total extret (suma de les quatre etapes) es pot comparar amb els resultats d'una extracció en aigua règia per separat per obtenir la validació del procediment.

Davidson et al. [1.19] estudien la possibilitat de canviar el reactiu d'aquesta segona etapa i utilitzar oxalat d'amoni, reactiu utilitzat àmpliament per determinar la quantitat d'òxids de ferro en sòls. Aquest reactiu, però, presenta problemes de solubilitat de les espècies d'oxalat, i per tant no és recomanable si els anàlits poden formar precipitats insolubles amb oxalat, com és el cas de Pb o Cu.

Les fases importants del sediment que enllacen metalls són els òxids de Fe i Mn, diverses fases orgàniques i els sulfurs de Fe. Aquests últims, particularment els sulfurs àcids (AVS, que consisteixen principalment en sulfurs de Fe), han rebut una atenció considerable com a fase reactiva per a metalls com Ag, Cd, Cu, Ni, Pb i Zn en sediments anòxics. Els estudis suggereixen que les concentracions de metall en l'aigua de porus seran insignificants quan la concentració de sulfurs volàtils sigui superior a la concentració de

---

metalls extrets en aquestes condicions (SEM). D'aquesta manera, no hi haurà toxicitat per als organismes bentònics si hi ha suficients sulfurs per complexar tots els metalls en el sediment [1.20, 1.21]. Els AVS enllacen metalls catiònics (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn) i donen complexos de sulfurs insolubles, i així redueixen la toxicitat dels metalls. La relació molar dels metalls extrets simultàniament (SEM, metalls extrets en la determinació dels AVS) amb AVS (SEM/AVS) es va proposar per predir la toxicitat dels metalls per a un ampli interval de tipus de sediments; encara queden, però, algunes preguntes sense resposta sobre la geoquímica del sediment, les cinètiques d'enllaç i l'alliberament i les interaccions organismes-sediment. Es considera l'ús de procediments d'extracció seqüencial com a tècnica complementària per explorar el fraccionament dels metalls en els sediments [1.22, 1.23].

L'objectiu d'aquest estudi és avaluar l'aplicabilitat de l'esquema d'extracció seqüencial proposat pel BCR en sediments del mar Menor; així mateix, es comparen els resultats obtinguts amb la relació entre els paràmetres SEM i AVS. D'altra banda, com que l'esquema BCR no està recomanat per a sediments amb un elevat contingut en carbonats, els comparem amb els resultats obtinguts en aplicar un altre esquema d'extracció seqüencial, concretament el proposat per Tessier, per determinar si les informacions obtingudes a partir dels dos procediments diferents es poden relacionar.



## 1.2. EXPERIMENTAL

### 1.2.1. Equips i reactius

S'ha utilitzat un instrument de plasma acoblat inductivament, ICP-OES (Liberty RL, Varian) amb un nebulitzador de tipus en V per a la determinació de zinc, plom, cadmi, coure, níquel i arsènic en les digestions i els extractes. Les longituds d'ona de treball seleccionades van ser: Zn (202,551 nm), Pb (220,353 nm), Cd (214,438 nm), Cu ( 324,754 nm), Ni (221,647 nm) i As (193,696 nm).

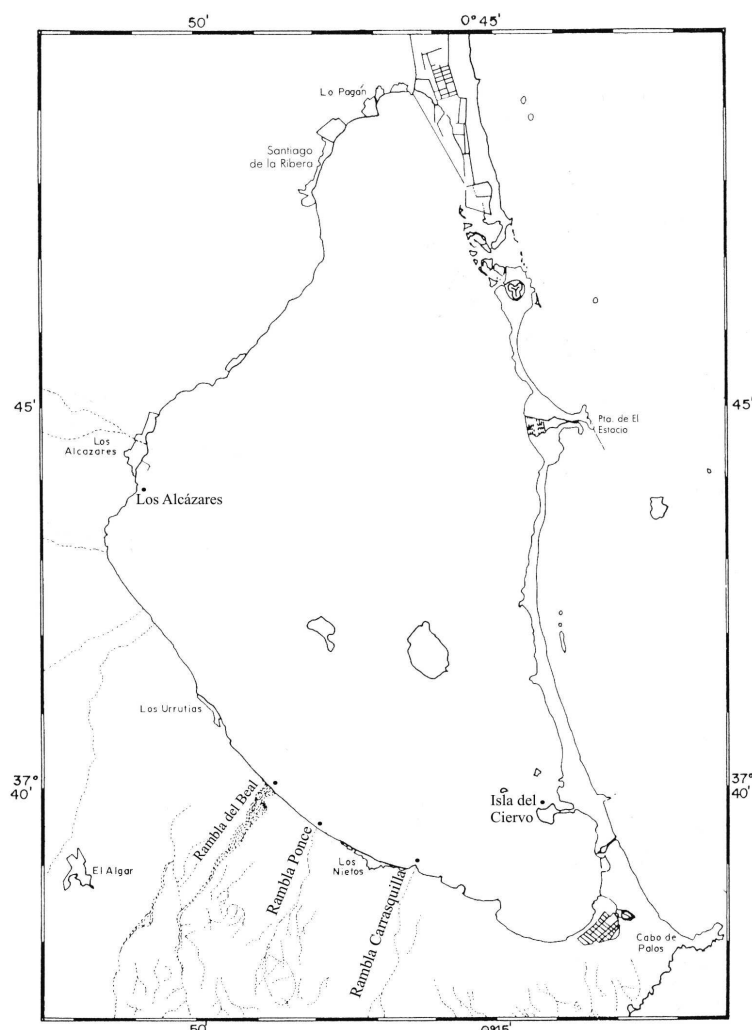
Per a les digestions àcides de les mostres s'ha utilitzat un microones Milestone ETHOS PLUS (Gomensoro, SA) amb control de temperatura i reactors de tefló PFA. S'ha emprat una centrífuga Mixtasel P-Selecta per a la separació dels extractes. Per mantenir les mostres agitadaes durant les extraccions s'ha utilitzat un agitador rotatori Dinko. Per a la mesura i l'ajust del pH, quan es requeria, s'ha fet servir un pH-metre Crison GLP22. S'ha caracteritzat la distribució per mida de partícula dels sediments mitjançant un espectròmetre de difracció làser d'alta resolució Mastersizer/E Analyser de la firma Malvern Instruments Ltd.

Tots els reactius utilitzats han estat de qualitat per a anàlisi o suprapurs. Els patrons de treball de sulfur es preparen diàriament per dilució d'un estoc ( $\sim 50 \text{ mmol L}^{-1}$ ), que preparem dissolent  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$  (Sigma-Aldrich, Steinheim) en aigua desoxigenada. La solució de tampó antioxidant (SAOB) es prepara utilitzant  $\text{NaOH } 2 \text{ mol L}^{-1}$ , àcid ascòrbic  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  i EDTA  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (Panreac, Espanya). Les solucions extractants necessàries per al procediment BCR es preparen a partir de reactius de qualitat per a anàlisi (l'àcid acètic, el peròxid d'hidrogen, l'àcid clorhídric i el clorur d'hidroxilamina són de Sigma-Aldrich (Steinheim); l'acetat d'amoni, de Riedel-deHäen; l'acetat de sodi, de Fluka, i el clorur de magnesi, de Panreac). Els patrons dels metalls es preparen per dilució de les solucions estoc ( $1.000 \text{ mg L}^{-1}$ ) de cada element (Spectrascan); s'utilitzen patrons diferents per a cada medi extractant.

## 1.2.2. Procediment experimental

### 1.2.2.1. Presa de mostres

S'han recollit mostres de sediment superficial en diferents punts del mar Menor (**figura 1.1**). Principalment s'han estudiat les desembocadures de tres de les rambles que drenen la Sierra de Cartagena (Beal, Ponce i Carrasquilla), ja que són les principals introductores de metall al mar Menor, perquè drenen el material procedent de la Sierra de Cartagena. Com a punts de referència s'han utilitzat un punt de la zona sud del Mar Menor, però allunyat de la zona de descàrrega de les rambles (Isla del Ciervo), i un punt més al nord (Los Alcázares). S'han realitzat diferents campanyes de presa de mostres: febrer 2004, agost 2004 i febrer 2006.



**Figura 1.1.** Mapa de localització dels punts de presa de mostra.

En cada punt s'ha recollit sediment superficial (0-20 cm) utilitzant pales de polipropilè i transferint-lo a bosses del mateix material. Un cop al laboratori, els sediments s'han assecat a temperatura ambient, i, un cop secs, s'han tamisat a mides de 500 i 63  $\mu\text{m}$ . L'estudi per mida de partícula és important, ja que s'ha proposat que les concentracions de metall en la fracció fina ( $<63 \mu\text{m}$ ) ens donen el millor indicador de les condicions ambientals, perquè els organismes bentònics poden trobar-se directament exposats a aquesta mida de partícula. A més, Davis i Atkins [1.24] troben en el seu estudi que aquesta fracció conté un ordre de magnitud més elevat en concentració de metalls que la fracció de 2 mm. De tota manera, en sistemes fluvials que han estat rebent residus històrics de mineria, és important avaluar les mides de partícula del sediment al llarg d'un ampli interval, ja que molts d'aquests residus miners inclouen tant mides d'argila ( $<63 \mu\text{m}$ ) com mida de sorra (63  $\mu\text{m}$ -2 mm). Val a dir que també s'han realitzat proves assecant el sediment a temperatura ambient i sense assecar, mantenint-lo en condicions anòxiques (aquestes experiències s'han realitzat sobre la fracció total del sediment), ja que alguns autors consideren que assecar el sediment provoca canvis en el fraccionament dels metalls i, quan treballem amb sediments anòxics, recomanen manejar-los sota atmosfera inert [1.4, 1.25, 1.26].

Per a la determinació dels sulfurs volàtils, les mostres s'han de mantenir protegides del contacte amb l'oxigen, per evitar l'oxidació dels sulfurs, la qual cosa ens induiria a subestimar el contingut de sulfurs en els sediments [1.27]. Per aquest motiu, en el moment d'agafar la mostra s'omple de sediment i aigua un contenidor de polipropilè, de manera que no hi quedi aire, i aquest contenidor es posa dins d'un altre ple d'aigua. D'aquesta manera es mantenen, refrigerats, fins a la seva anàlisi, que s'ha de realitzar de manera immediata i en cap cas s'ha de fer passats 7 dies de la presa de mostra, per evitar de nou pèrdues significatives per l'oxidació dels sulfurs.

### *1.2.2.2. Esquemes d'extracció seqüencial*

El procediment d'extracció seqüencial en tres etapes proposat pel BCR ha estat lleugerament modificat; per raons pràctiques el pes de mostra i el volum d'extractant s'han reduït a la meitat, mantenint la mateixa relació pes-volum [1.28]. Els detalls del protocol experimental seguit es troben en la **figura 1.2**.

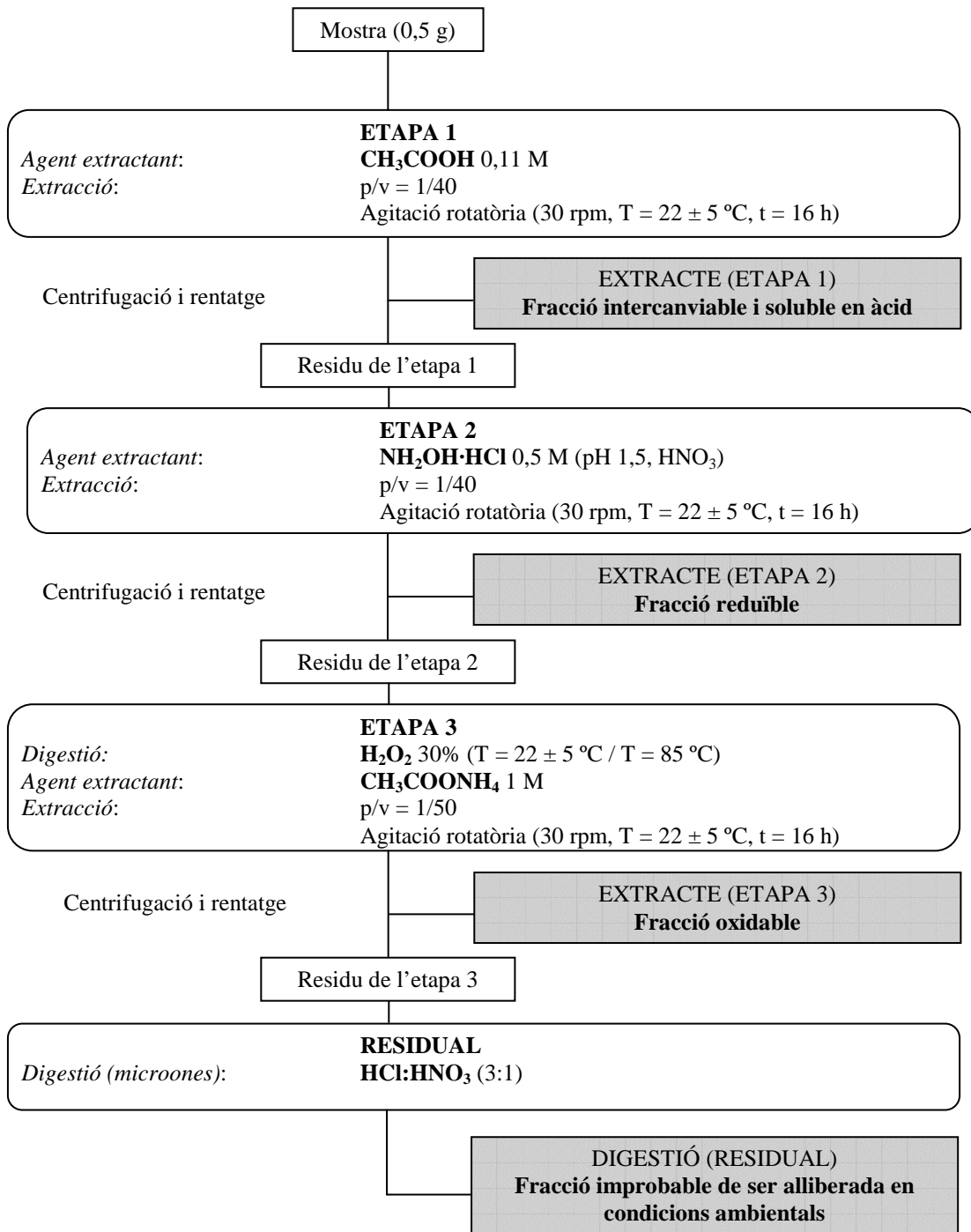
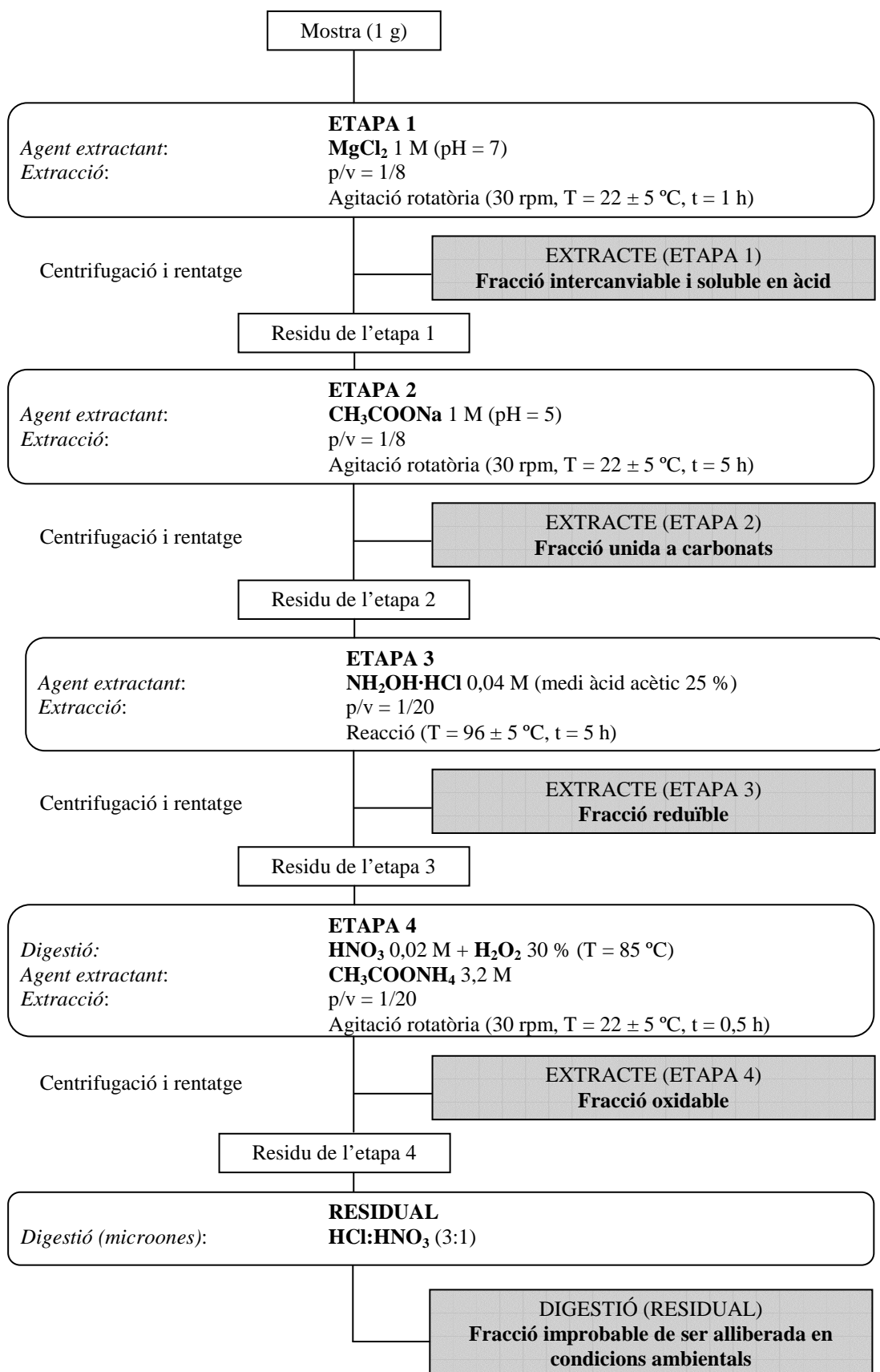


Figura 1.2. Procediment experimental de l'esquema d'extracció seqüencial BCR [1.16, 1.17, 1.28].



**Figura 1.3.** Procediment experimental de l'esquema d'extracció seqüencial proposat per Tessier [1.13,1.29,1.30].

Per a una avaluació interna del procediment, es realitza la digestió del residu de la tercera etapa en aigua règia (etapa residual) i es compara la suma de les concentracions elementals trobades en les tres etapes més la residual amb la concentració *pseudototal* (determinada després de la digestió amb aigua règia) de la mostra original. Aquest balanç de massa coincideix amb desviacions de  $\pm 10\%$ , i confirma la precisió del treball analític. També s'ha avaluat el procediment utilitzant un material de referència (BCR-701) amb valors certificats de les concentracions de Cd, Cr, Cu, Ni, Pb i Zn en les tres etapes del BCR i amb valors indicatius de les concentracions d'aquests sis elements en l'extracció amb aigua règia.

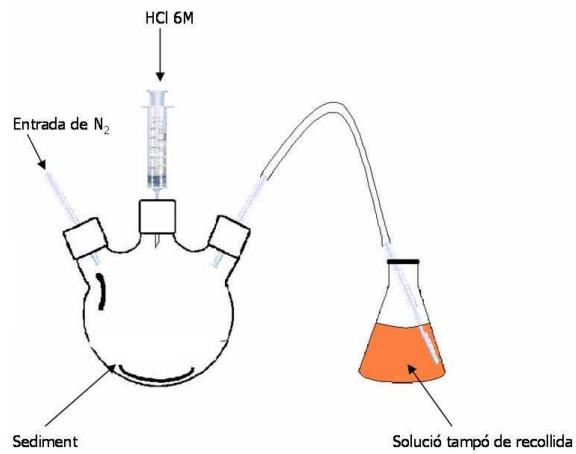
S'han comparat els resultats obtinguts mitjançant el procediment d'extracció seqüencial BCR amb els obtinguts mitjançant el de Tessier. Es pot veure el protocol d'aquest esquema a la **figura 1.3**.

#### 1.2.2.3. Determinació dels sulfurs volàtils

En paral·lel a l'aplicació dels esquemes d'extracció seqüencial, es va portar a terme la determinació dels paràmetres AVS i SEM per obtenir una caracterització geoquímica més completa del sediment i avaluar-ne la potencial toxicitat. Amb aquesta finalitat, es va posar a punt el mètode de determinació basat en el mètode EPA 821-R-91-100 [1.31, 1.32]. En aquest mètode, els sulfurs, per addició d'àcid clorhídric, generen àcid sulfhídric que atrapem en una dissolució bàsica, de manera que podem determinar l'ió  $S^{2-}$  potenciomètricament mitjançant un elèctrode selectiu d'ions.

Per a la determinació dels sulfurs volàtils en els sediments, utilitzem una bossa de guants amb atmosfera de nitrogen per tal de prevenir l'oxidació dels sulfurs presents en el sediment. Dins d'aquesta bossa, manipularem el sediment que hem preservat del contacte amb l'oxigen i en posarem uns 10 grams dins un baló de tres boques; un cop tapat ja el podem treure fora de la bossa i procedir al muntatge experimental que es mostra a la **figura 1.4**. Per una de les boques del baló fem circular nitrogen durant uns 10 minuts. Per la tercera boca del baló introduïm, mitjançant una xeringa de polipropilè, 35 ml d'àcid clorhídric, que, en reaccionar amb els sulfurs metàl·lics del sediment, formarà àcid sulfhídric gas, que és arrossegat pel corrent de nitrogen fins a la dissolució de SAOB. Un cop addicionat l'àcid clorhídric deixarem que reaccionï durant 30 minuts. Passat aquest temps, mesurarem potenciomètricament la concentració de sulfur en la dissolució de

SAOB. La dissolució que queda en el baló és filtrada i mesurada mitjançant ICP-OES per determinar la concentració dels metalls extrets simultàniament (SEM).



**Figura 1.4.** Esquema experimental per a la determinació dels AVS i els metalls extrets simultàniament (SEM). Com veiem, el sediment es troba en el baló, on afegim l'àcid clorhídric per formar àcid sulfhídric, que és arrossegat pel corrent de nitrogen fins a la solució tampó antioxidant (SAOB).

### 1.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

Encara que aquest estudi s'ha centrat en el sediment, s'ha considerat interessant disposar de dades de caracterització de l'aigua del mar Menor en els diferents punts de presa de mostra. Es va mesurar *in situ* pH, temperatura i conductivitat. Un cop al laboratori es determinen els nutrients i l'alcalinitat. Els resultats obtinguts es mostren a la **taula 1.1**.

**Taula 1.1.** Caracterització de l'aigua del mar Menor en els punts de presa de mostra de sediments al febrer del 2004.

	ISLA CIERVO	CARRASQUILLA	PONCE	BEAL
Temperatura (°C)	14,7	17,2	11,6	10,9
pH	8,7	8,65	8,3	8,2
Conductivitat (mS cm <sup>-1</sup> )	46,2	46,7	46,8	47,2
Alcalinitat (meq L <sup>-1</sup> )	5,67	5,48	6,42	8,55
PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	-	1,18	-	-
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	3.432	3.362	3.489	3.508
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	0,57	0,66	1,07	4,41
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	7,80	6,52	8,18	8,67
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	0	0	0	0
Cl <sup>-</sup> (mg L <sup>-1</sup> )	23.075	22.720	24.140	22.365

Les diferències de temperatura entre diferents punts són degudes a l'horari en el qual es va realitzar el mostreig, ja que, com que és un mar poc profund, es veu molt afectat per l'escalfament provocat pel sol. D'aquesta manera, els punts mostrejats a primera hora presenten una temperatura més baixa, que va augmentant a mesura que avança el dia. El pH de l'aigua és en tots els punts superior a 8; trobem una aigua alcalina i molt tamponada. El pH i la conductivitat són similars en tots els punts.

L'aigua de mar ha estat analitzada per ICP-MS per determinar-ne el contingut en metalls. Com es pot observar a la **taula 1.2**, les concentracions de metall en l'aigua són molt baixes, tot i l'elevat contingut en el sediment.



**Taula 1.2.** Concentracions dels metalls en l'aigua del mar Menor determinades per ICP-MS.

	[Zn] (ppb)	s.d.	[Cd] (ppb)	s.d.	[Pb] (ppb)	s.d.
PONCE	<80		<2		<1,5	
CARRASQUILLA	<80		<2		<1,5	
BEAL	<80		2,6	0,3	1,7	0,6

S'ha fet l'anàlisi granulomètrica de la fracció fina de les mostres de sediment (de mida inferior a 500 micres). La composició de la mida de gra és calculada automàticament i classificada en 32 intervals de mides [1.33]. Els resultats de la mesura de la distribució de la mida de partícula corresponents a les diferents estacions de mostreig es mostren a la **taula 1.3**. Aquesta informació és rellevant en l'estudi de la biodisponibilitat dels metalls, ja que, per una part, la fracció més petita (<63  $\mu\text{m}$ ) representa típicament la menor quantitat de mostra per massa (<10 %), però conté la concentració més elevada de metalls [1.34]. D'altra banda, és la fracció fina (<63  $\mu\text{m}$ ) la que pot proporcionar el millor indicador de les condicions ambientals, ja que els organismes bentònics poden estar directament exposats a aquesta mida de partícula [1.24].

**Taula 1.3.** Resultats de la distribució segons la mida de partícules del sediment per a les diferents mostres estudiades.

	Isla Ciervo	Ponce	Carrasquilla	Beal
Mida mitjana ( $\mu\text{m}$ )	330	370	230	210
Percentil 90 ( $\mu\text{m}$ )	347	380	215	200
Percentil 10 ( $\mu\text{m}$ )	108	190	50	35
Percentatge <63 $\mu\text{m}$	8	3	10	13

### 1.3.1. Esquemes d'extracció seqüencial

Ens hem centrat més en l'estudi de Pb, Zn i Cd, ja que aquests són els metalls que tenen un focus de contaminació a la zona per les activitats mineres que s'hi han desenvolupat al llarg de la història. La caracterització química del sediment mitjançant l'esquema d'extracció seqüencial BCR s'ha realitzat sobre dues fraccions del sediment, les corresponents a la mida de partícula  $<63 \mu\text{m}$  i  $<500 \mu\text{m}$ , i sobre el total de la mostra, com podem veure a les **figures 1.5-1.7**. Les mostres s'anomenen segons el punt del qual provenen (R, P, C i B, corresponents a sediment del punt de referència o de la desembocadura de les rambles Ponce, Carrasquilla i Beal, respectivament). També s'ha fet una comparació dels resultats que s'obtenen en realitzar el fraccionament de la mostra total sobre el sediment inalterat i un cop assecat, ja que s'ha apuntat, en estudis anteriors, que el fet d'assecar la mostra pot fer variar la distribució dels metalls traça [1.25]. Els resultats obtinguts no mostren diferències significatives entre el sediment inalterat o assecat, per la qual cosa considerem que assecar el sediment és la millor opció per fer les determinacions, ja que, d'aquesta manera, obtenim una mostra molt més homogènia i, d'altra banda, la humitat en el sediment varia amb el temps i, per tant, si no assequéssim, la mesura no seria prou reproducible.

En primer lloc, cal remarcar les elevades concentracions presents en el sediment, bàsicament de Pb i Zn. Si considerem les concentracions pseudototals, s'observa un gradient entre els punts que varia segons la mida de partícula estudiada. D'aquesta manera, quan treballem amb el sediment amb una mida de partícula gran, les concentracions més elevades es troben en els sediments de la desembocadura de les rambles de Beal i Carrasquilla, amb valors entre  $5.000\text{-}8.000 \text{ mg kg}^{-1}$  i  $2.000\text{-}3.000 \text{ mg kg}^{-1}$  en el cas del Pb per a Beal i Carrasquilla, respectivament, i  $5.000\text{-}8.000 \text{ mg kg}^{-1}$  i  $3.000\text{-}5.000 \text{ mg kg}^{-1}$  en el cas del Zn. Els valors són molt més baixos per als sediments de la desembocadura de Ponce:  $700\text{-}1.000 \text{ mg kg}^{-1}$  i  $600\text{-}1.500 \text{ mg kg}^{-1}$  per a Pb i Zn, respectivament. Quan estudiem la fracció fina del sediment ( $<63 \mu\text{m}$ ), trobem concentracions més elevades que en els casos anteriors. En els punts de referència els sediments sempre presenten concentracions molt més baixes, tot i que en alguns casos s'ha arribat a concentracions properes a  $1.000 \text{ mg kg}^{-1}$ .

Pel que fa al fraccionament del metall en els sediments, els resultats de l'aplicació de l'esquema d'extracció seqüencial BCR en el cas de Pb, Zn i Cd es troben en les **figures**

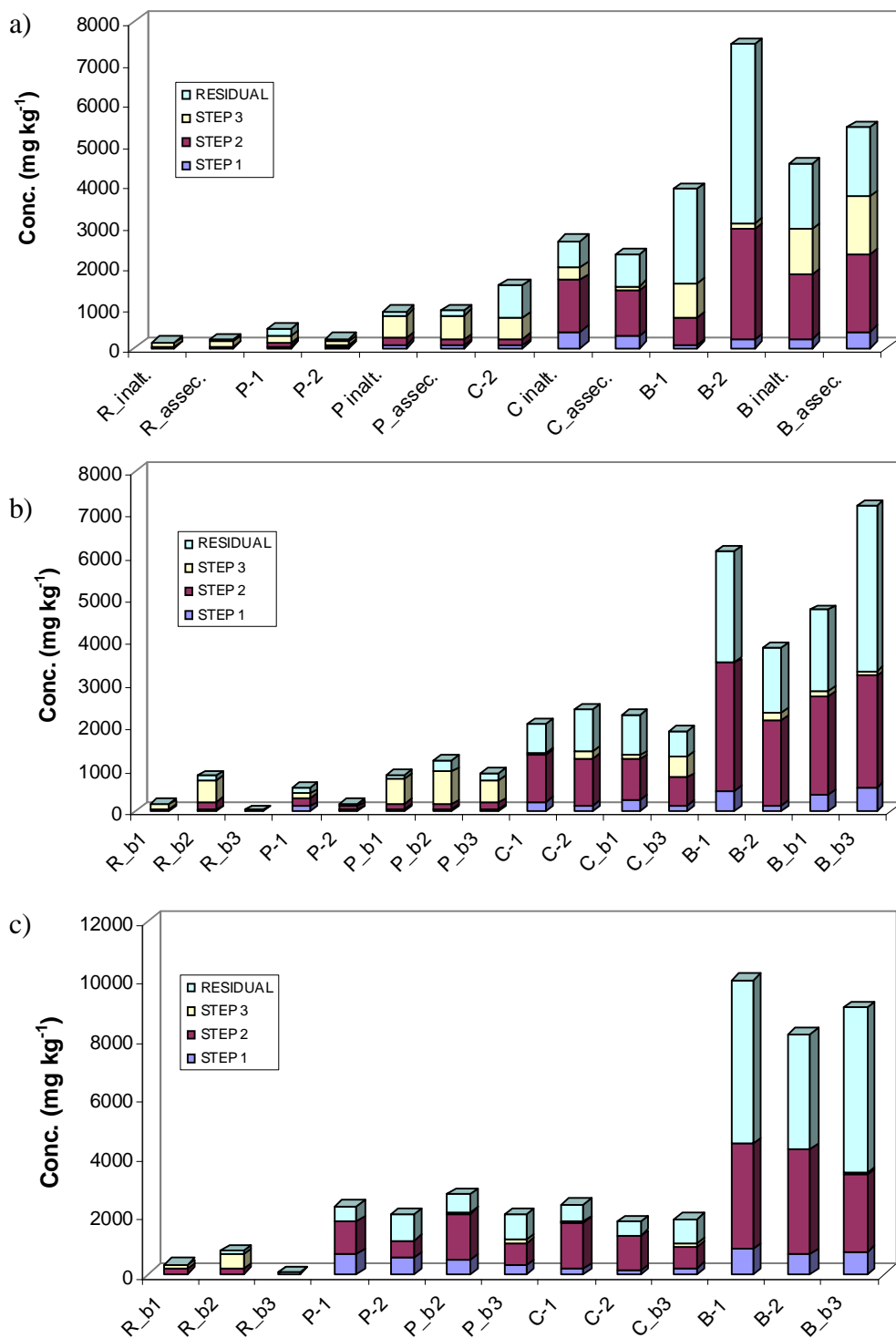
**1.5-1.7.** Podem observar que cada metall presenta un comportament diferent, com també s'observa un diferent fraccionament entre els diferents sediments estudiats.

En aquest treball s'ha avaluat la mobilitat de Pb, Zn, Cd, Cu, Ni i As. En el cas dels metalls Cu i Ni, es troben presents en baixes concentracions ( $19-130 \text{ mg kg}^{-1}$ ) i, a més, en fer el fraccionament dels metalls s'observa que la major part es troba en la fracció residual. Tot i que les concentracions d'As són elevades ( $30-750 \text{ mg kg}^{-1}$ ), el 100 % del metall es troba en l'etapa residual, cosa indica que no és biodisponible. És per aquest motiu que ens centrem en la discussió dels resultats de Pb i Zn, que es troben en concentracions molt elevades, ja que eren els dos metalls extrets. S'hi ha inclòs el Cd, que apareix com a impuresa en les menes explotades, per la seva elevada toxicitat.

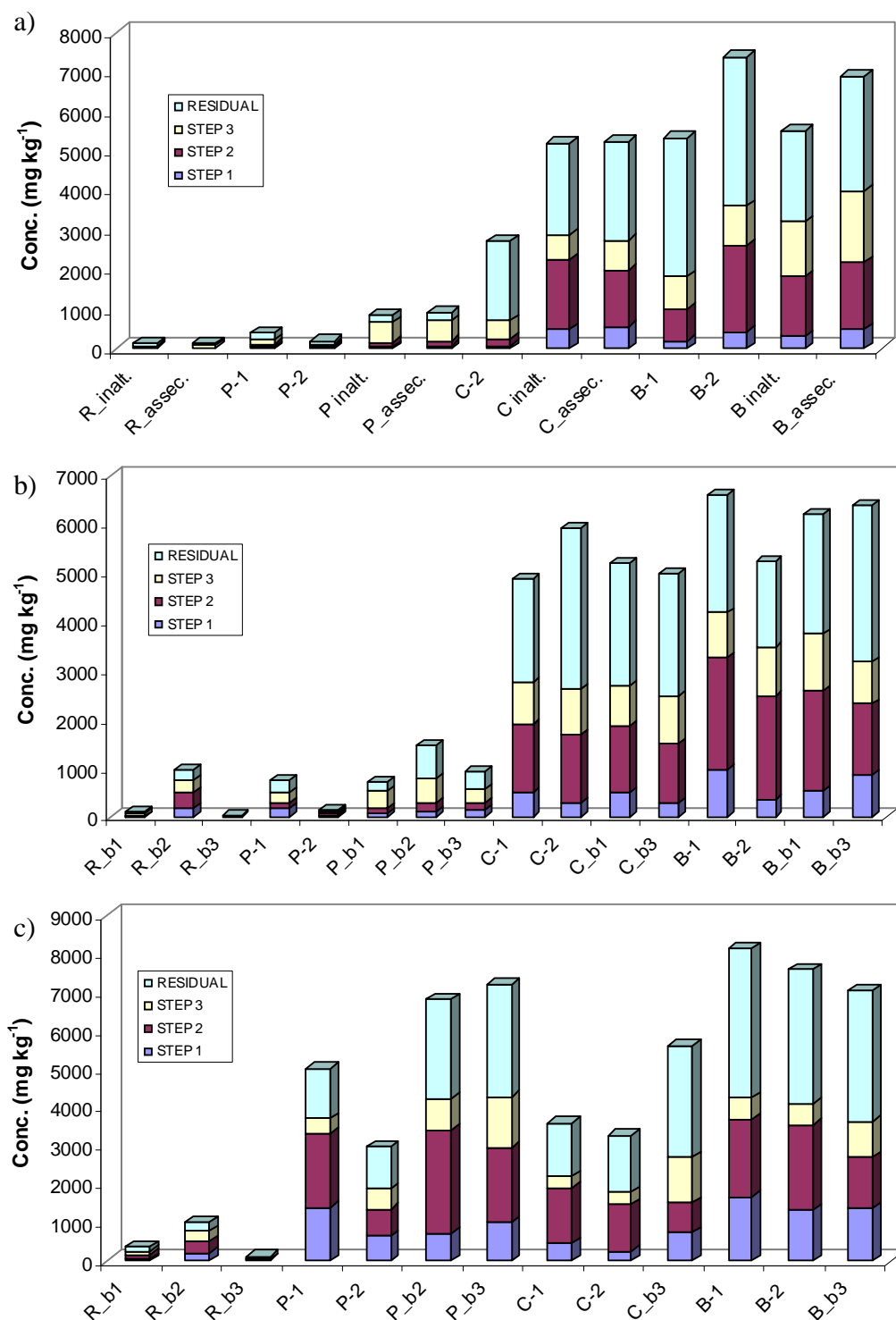
El sediment utilitzat com a referència presenta les concentracions més baixes de metalls, i s'extreuen majoritàriament en la tercera etapa del BCR, cosa que indica que els metalls es troben en forma reduïble (units a matèria orgànica i a sulfurs).

El sediment de la desembocadura de Ponce presenta concentracions de Pb i Zn inferiors a les corresponents en els sediments de Beal i Carrasquilla, excepte en la fracció fina del sediment, on les concentracions de Pb i Zn són comparables als valors trobats en el sediment de Carrasquilla. El fraccionament dels metalls depèn de la fracció de sediment que estudiem en cada cas. D'aquesta manera, el Pb i el Zn s'extreuen majoritàriament en la tercera etapa en la fracció total del sediment de Ponce, mentre que en la fracció amb mida de partícula inferior a  $500 \mu\text{m}$  es reparteixen principalment entre la segona i la tercera etapa, i quan avaluem la fracció inferior a  $63 \mu\text{m}$  els trobem entre la segona etapa i la residual, i el percentatge de Pb extret en la primera etapa augmenta fins a un 20-30 %. El Cd es troba majoritàriament en la segona etapa en la fracció total del sediment, mentre que en la fracció fina pren més importància la primera etapa (8-65 %).

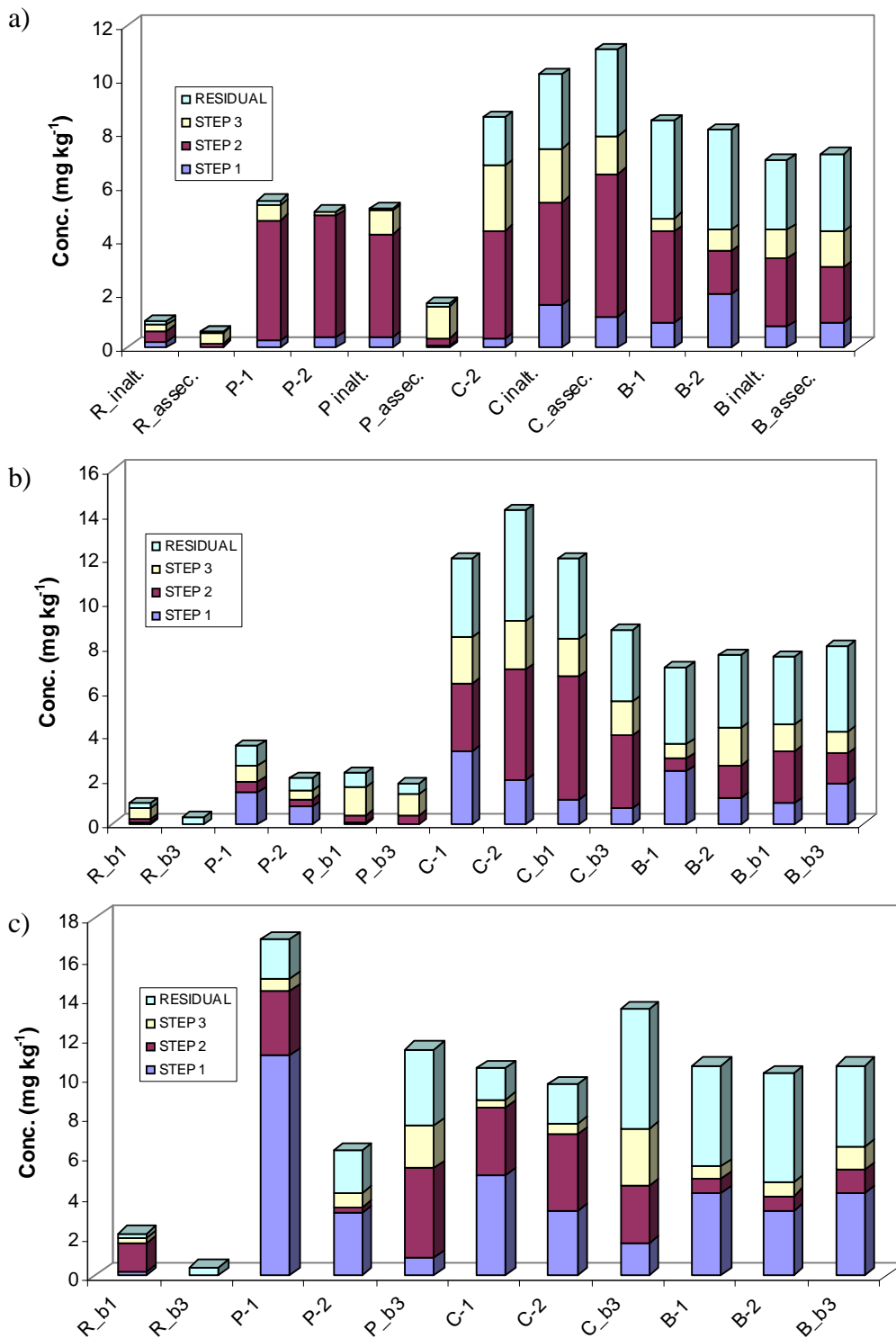
Els sediments de la desembocadura de les rambles de Beal i Carrasquilla presenten les concentracions de metall més elevades. El fraccionament és similar en ambdós casos. El metall és extret principalment en la segona etapa i la residual.



**Figura 1.5.** Resultats obtinguts mitjançant l'esquema d'extracció seqüencial BCR per a Pb: a) resultats per al sediment total, b) fracció de sediment amb una mida de partícula <500 μm, i c) fracció fina del sediment (<63 μm). Els números 1, 2 i 3 es refereixen a les diferents campanyes de mostreig (febrer del 2004, agost del 2004 i febrer del 2006, respectivament).



**Figura 1.6.** Resultats obtinguts mitjançant l'esquema d'extracció seqüencial BCR per a Zn: *a)* resultats per al sediment total, *b)* fracció de sediment amb una mida de partícula <500 μm, i *c)* fracció fina del sediment (<63 μm). Els números 1, 2 i 3 es refereixen a les diferents campanyes de mostreig (febrer del 2004, agost del 2004 i febrer del 2006, respectivament).



**Figura 1.7.** Resultats obtinguts mitjançant l'esquema d'extracció seqüencial BCR per a Cd: a) resultats per al sediment total, b) fracció de sediment amb una mida de partícula <500 μm, i c) fracció fina del sediment (<63 μm). Els números 1, 2 i 3 es refereixen a les diferents campanyes de mostreig (febrer del 2004, agost del 2004 i febrer del 2006, respectivament).

És important destacar que, en la fracció fina del sediment procedent de la desembocadura de Ponce, la concentració de metall extreta en la primera etapa del BCR és similar a l'extreta en el sediment procedent de la desembocadura de Beal i superior a la de Carrasquilla.

Per avaluar les implicacions ambientals s'han calculat els factors de contaminació individual ( $C_f^i$ ), que s'assumeix igual a la suma de les concentracions de metall en les fases mòbils (suma de les tres primeres etapes) dividit pel contingut en l'etapa residual. El factor de contaminació global ( $C_f$ ) es determina com la suma dels factors individuals [1.35]. A la **taula 1.4** es mostren els factors de contaminació calculats. Veiem que el sediment de la desembocadura de Ponce és el que presenta els factors de contaminació més elevats, la qual cosa indica que aquest és el que presenta major risc ambiental. I el sediment de referència presenta els factors de contaminació més baixos, com es podia esperar. Els factors de contaminació per als sediments de la desembocadura de Beal i Carrasquilla són similars.

**Taula 1.4.** Valors de factors de contaminació individuals ( $C_f^i$ ) i de factors de contaminació global ( $C_f$ ) de les diferents mostres estudiades.

	$C_f^i$					$C_f$
	Pb	Zn	Cd	Cu	Ni	
Referència <500	0,44	0,09	0,00	0,91	0,00	1,44
Referència <63	0,71	0,82	0,00	1,62	0,13	3,28
Ponce <500	4,33	1,60	3,19	0,76	0,20	10,07
Ponce <63	1,32	1,47	1,98	0,87	0,40	6,04
Carrasquilla <500	2,20	1,00	1,73	0,42	0,22	5,58
Carrasquilla <63	1,25	0,93	1,23	0,72	0,27	4,42
Beal <500	0,84	0,99	1,07	0,48	0,40	3,79
Beal <63	0,61	1,06	1,58	0,74	0,60	4,59

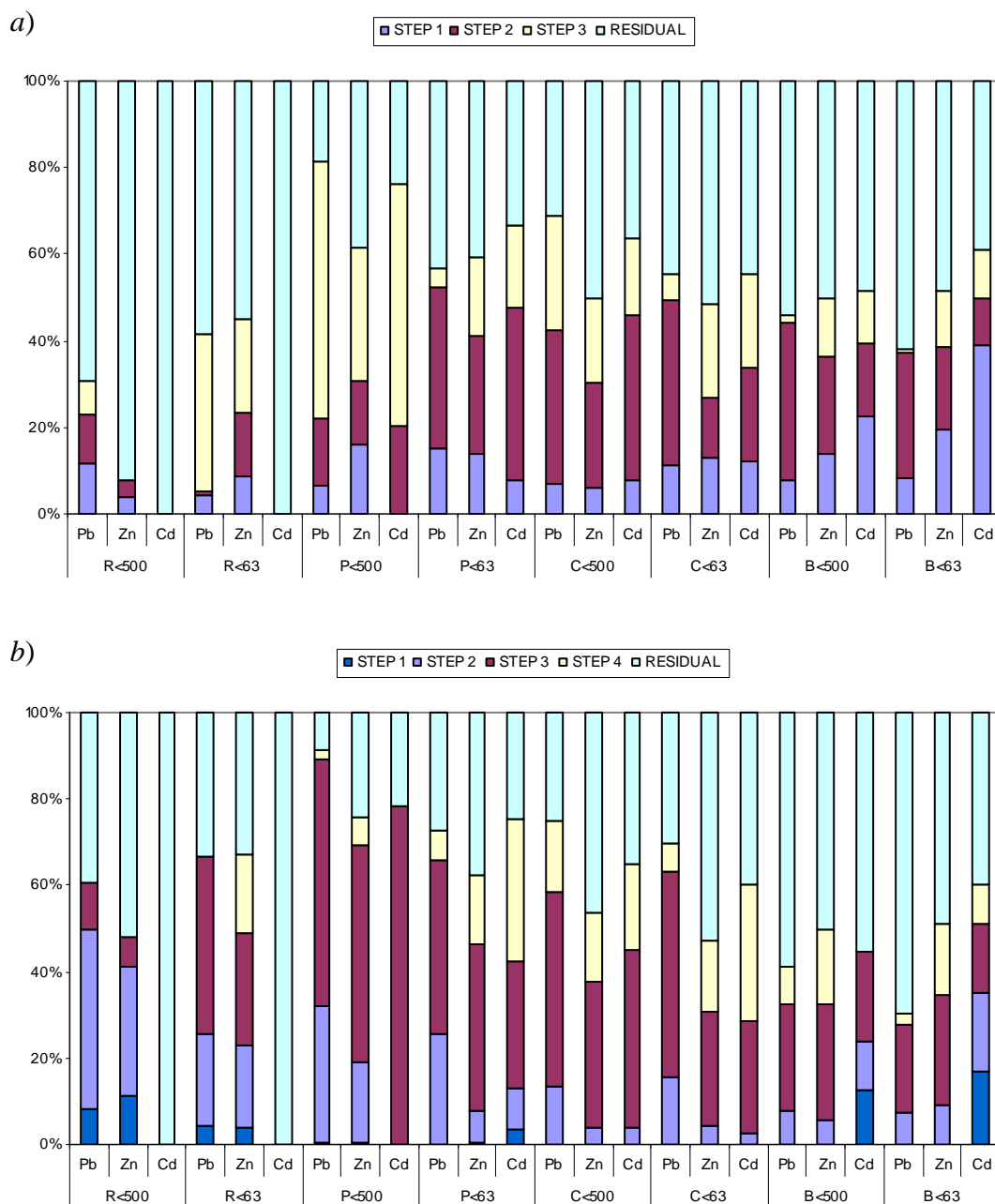
Pb i Cd són els metalls que presenten uns factors de contaminació individuals més elevats: arriben a 4,33 i 3,19, respectivament, en el sediment de la desembocadura de Ponce. En general, és el Cd el que presenta majors factors de contaminació individuals i el Pb i el Zn presenten factors similars. En canvi, Cu i Ni presenten els factors de contaminació individuals més baixos, de 0,42 a 1,62 per al Cu i de 0 a 0,6 per al Ni. Això

indica que el Cd és el metall més mòbil, mentre que Cu i Ni són els que es troben més retinguts en el sediment.

Com s'ha comentat, també s'han realitzat extraccions seguint el procediment d'extracció seqüencial proposat per Tessier, per comparar els resultats obtinguts en els dos procediments. Les dues primeres etapes de Tessier correspondrien a la primera etapa del BCR, tal com es pot veure a les **figures 1.2 i 1.3**, així com la tercera i quarta de Tessier equivaldrien a la segona i la tercera del BCR, respectivament. A la **figura 1.8** podem veure els resultats de l'aplicació dels dos procediments: es pot apreciar que el comportament general es manté per als dos esquemes. Si bé és cert que la tercera i la quarta etapa del Tessier no es corresponen exactament amb la segona i la tercera del BCR, en el cas de les dues primeres etapes del Tessier sí que observem un comportament similar a la primera del BCR. També veiem que amb l'esquema d'extracció Tessier extraïem un percentatge superior de metall en les quatre primeres etapes que el corresponent a les tres primeres etapes del BCR. Ianni et al. [1.36], en el seu estudi on comparaven els resultats de l'aplicació de l'esquema d'extracció BCR amb un Tessier modificat, ja observaven diferències en el fraccionament dels metalls en aquests dos esquemes, causades perquè el darrer és massa agressiu. Per a estudis ambientals, en els quals volem estudiar el metall més mòbil i disponible, recomanem utilitzar l'esquema d'extracció seqüencial BCR.

Per aquest motiu hem utilitzat el procediment d'extracció seqüencial BCR, per predir la mobilitat i la disponibilitat dels metalls presents en els sediments del mar Menor.



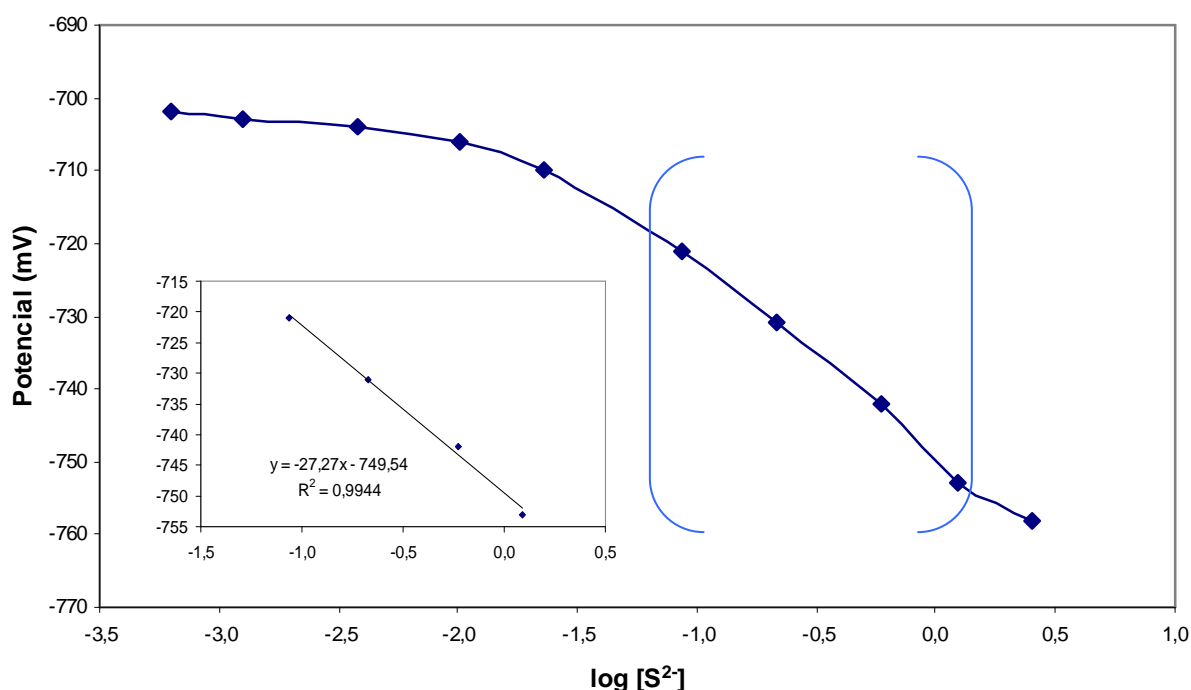


**Figura 1.8.** Comparació dels resultats obtinguts mitjançant l'esquema d'extracció seqüencial proposat pel BCR (a) i el de Tessier (b), tant per a la fracció de sediment inferior a 500 µm com per a la inferior a 63 µm. En aquest cas, el sediment de referència correspon al de Los Alcázares.

### 1.3.2. Determinació dels sulfurs volàtils

El mètode de determinació dels AVS, com ja hem comentat, es basa en la formació de  $\text{H}_2\text{S}$  a partir dels sulfurs de la mostra, per acidificació amb  $\text{HCl}$ . Aquest és atrapat en una solució aquosa bàsica i llavors pot ser determinat mitjançant diferents tècniques. En aquest cas hem escollit la determinació potenciomètrica mitjançant un elèctrode selectiu d'ions.

En primer lloc es va determinar l'interval de linealitat del mètode potenciomètric i la seva sensibilitat, d'una banda, i, de l'altra, es va avaluar el procediment mitjançant l'anàlisi de sediments fortificats. Per conèixer l'interval de linealitat de l'elèctrode selectiu ( $\text{S}^{2-}$ ) agafem el blanc de dissolució tampó antioxidant i hi anem afegint petits volums de solució de sulfur de sodi estandarditzada. En cada addició, mesurem el potencial i el representem confrontat a la concentració de sulfur en dissolució, com es mostra a la **figura 1.9**. En aquesta figura veiem que tenim una zona lineal que podem utilitzar per establir l'interval de treball i el límit de detecció de la tècnica.



**Figura 1.9.** Gràfic del potencial confrontat amb el logaritme de la concentració de sulfur present en la dissolució. La zona assenyalada és la zona de resposta lineal que segueix l'equació de Nernst.

Comprovem la linealitat en aquest interval i l'utilitzem per calcular el límit de detecció. Observem també que la resposta del potencial a la concentració està regida per la llei de Nernst, segons la qual el pendent de la nostra recta ha de ser del voltant de -29 mV. Observem a l'equació de la recta obtinguda (**figura 1.9**) un pendent molt proper a aquest valor. Per trobar el límit de detecció del mètode potenciomètric interpolem el senyal del blanc a la nostra recta, en el nostre cas,  $y_b = -702$ . Per tant:

$$LD = 10^{\left(\frac{y_b - b}{a}\right)} = 10^{\left(\frac{-702 + 749,54}{-27,27}\right)} = 0,018 \text{ ppm} = 18 \text{ ppb}$$

Un cop hem comprovat la linealitat del senyal de l'elèctrode i hem determinat el límit de detecció del mètode potenciomètric, utilitzem mostres fortificades per veure les recuperacions que obtenim en seguir el mètode EPA 821-R-91-100. En el nostre cas, hem utilitzat en primer lloc sediment de riu (procedent del riu Ter) i després sediment marí (recollit a prop de la desembocadura del riu Ter), ja que el nostre objectiu era analitzar mostres de sediment procedents del mar Menor. Per fortificar utilitzem el sediment sec i tamisat a 2 mm, que fortifiquem amb sulfur de zinc a un nivell del 10 %. Un cop tenim la quantitat de sulfur desitjada, procedim a la seva extracció seguint el mètode EPA, per a la seva posterior determinació potenciomètrica, tal com podem veure a la **taula 1.5**.

**Taula 1.5.** Resultats per a les tres fortificacions fetes en cada tipus de mostra: sediment de riu i de mar. Veiem que les recuperacions del mètode són acceptables.

Mostra	Replicat	g ZnS pesat	% ZnS	Concentració teòrica	Concentració trobada	% recuperació
Sediment de riu	1	0,0032	10	3,2	2,693	84
	2	0,0035	10	3,5	3,205	92
	3	0,0019	10	1,9	2,073	109
Sediment de mar	1	0,0025	10	2,5	2,664	106
	2	0,0024	10	2,4	2,443	102
	3	0,0033	10	3,3	3,455	105

Un cop comprovat que les recuperacions obtingudes amb el mètode són acceptables, passem a analitzar les mostres de sediments recollides al mar Menor. Aquestes s'han preservat evitant el contacte amb l'oxigen i s'han fet les determinacions en els 7 dies posteriors al mostreig sobre la mostra inalterada, sense assecar ni tamisar. S'han realitzat proves en temps superiors i amb el sediment assecat, i es veu clarament la disminució de la concentració de sulfurs. Per això és important realitzar la mesura en els dies immediatament posteriors al mostreig i evitar el contacte de la mostra amb l'oxigen.

La **taula 1.6** mostra els resultats de la determinació dels sulfurs àcids (AVS), les concentracions dels metalls extrets simultàniament (SEM) i la relació molar SEM/AVS per a les mostres de les diferents campanyes de mostreig (febrer i agost del 2004). Pb i Zn són els metalls extrets simultàniament en major concentració. Els altres metalls es troben en concentracions molt inferiors, perquè Pb i Zn eren els components majoritaris del mineral explotat.

Si ens fixem ara en la relació molar SEM/AVS, per al sediment de referència és inferior a 1, cosa que ens indica que es pot considerar aquest sediment com a no tòxic. En canvi, en el cas dels altres sediments, aquesta relació és superior a 1, cosa que ens indica que els sulfurs no són la fase enllaçant majoritària en aquest cas.

**Taula 1.6.** Resultats de la determinació dels AVS i SEM (metalls extrets simultàniament) per a cada mostra i la relació molar entre SEM i AVS, corresponent a la mitjana de dues determinacions.

	REFERÈNCIA		PONCE		CARRASQUILLA	BEAL
	Febrer	Agost	Febrer	Agost	Febrer	Febrer
<b>Pb (mol kg<sup>-1</sup>)</b>	3,0E-04	1,4E-03	1,5E-03	4,1E-03	5,497E-03	9,073E-03
<b>Zn (mol kg<sup>-1</sup>)</b>	7,8E-04	4,6E-03	2,8E-03	6,6E-03	2,369E-02	2,584E-02
<b>Cd (mol kg<sup>-1</sup>)</b>	1,23E-06	8,01E-06	4,6E-06	3,7E-06	1,5E-05	9,43E-06
<b>Cu (mol kg<sup>-1</sup>)</b>	1,18E-05	9,44E-05	9E-06	1E-05	4,80E-05	1,3E-04
<b>Ni (mol kg<sup>-1</sup>)</b>	1,5E-05	3,4E-05	2E-05	3E-05	3,6E-05	3,1E-05
<b>SEM (mol kg<sup>-1</sup>)</b>	1,1E-03	6,2E-03	4,3E-03	1,1E-02	2,9E-02	3,5E-02
<b>AVS (mol kg<sup>-1</sup>)</b>	3,49E-03	1,2E-02	3,93E-03	2,2E-03	4,05E-03	2,8E-03
<b>SEM/AVS</b>	<b>0,32</b>	<b>0,51</b>	<b>1,1</b>	<b>4,9</b>	<b>7,2</b>	<b>13</b>

Els resultats corresponents a les relacions SEM/AVS es poden relacionar amb els resultats obtinguts en els procediments d'extracció seqüencial. Així, veiem que, en el cas del sediment de referència, els metalls s'extreien majoritàriament en la tercera etapa del BCR, la qual cosa indica que els metalls es troben en forma oxidable (units majoritàriament a matèria orgànica i sulfurs), i s'explica d'aquesta manera una relació inferior a 1. D'altra banda, la resta de sediments presenten una relació SEM/AVS superior a 1, i, en els resultats obtinguts mitjançant el procediment d'extracció seqüencial, veiem que els metalls es troben en forma reduïble (enllaçats principalment a òxids de ferro i manganès) pel que podem dir que no es troben units majoritàriament a matèria orgànica i sulfurs.

---

## 1.4. CONCLUSIONS

Les principals conclusions que es poden extreure d'aquest estudi són les següents:

1. Les concentracions de metall en el sediment són molt elevades, principalment les corresponents a Pb i Zn. Observem diferències en la concentració de metalls en el sediment, depenent de la fracció de sediment avaluada en cada cas. De manera general, la fracció fina del sediment presenta concentracions més elevades.
2. S'han aplicat dos esquemes d'extracció seqüencial diferents sobre les mostres de sediment, i s'obtenen diferències en el fraccionament dels metalls. Es decideix utilitzar l'esquema BCR, ja que ens interessa avaluar la mobilitat i la disponibilitat dels metalls, i l'esquema Tessier es considera massa agressiu per aquest propòsit.
3. Pb i Zn són els metalls que es troben en concentració més elevada i s'extreuen, principalment, en la segona etapa del BCR, la qual cosa indica que es troben en forma reduïble (units a òxids de Fe i Mn). El Cd es troba en concentracions inferiors, però en la fracció fina del sediment, s'extreu en quantitat important en la primera etapa del BCR, cosa que indica la seva mobilitat. Cu, Ni i As es troben presents en el sediment, però estan enllaçats en l'estructura mineral del sediment (fracció mineral), per la qual cosa no es consideren mòbils o disponibles.
4. L'estudi dels factors de contaminació ens indica que el Cd és el metall més mòbil, amb els factors de contaminació individuals més elevats, mentre que Cu i Ni són els més retinguts, amb els factors de contaminació individuals més baixos.
5. La determinació dels sulfurs volàtils (AVS) i dels metalls extrets simultàniament (SEM) ens indica que ens trobem amb sediments anòxics on els sulfurs no són la fase enllaçant principal, excepte en el cas del sediment de referència, on trobem una relació molar SEM/AVS inferior a 1.

## 1.5. REFERÈNCIES

- 1.1- PEÑUELAS J, FILELLA I (2002) Metal pollution in Spanish terrestrial ecosystems during the twentieth century. *Chemosphere* 46:501-505
- 1.2- DAS AK *et al.* (1995) Metal speciation in solid matrices. *Talanta* 42:1007-1030
- 1.3- MANAHAN SE (2007) *Introducción a la química ambiental*, (1a ed.) Barcelona: Editorial Reverté
- 1.4- SANTOS BERMEJO JC, BELTRÁN R, GÓMEZ ARIZA JL (2003) Spatial variations of heavy metals contamination in sediments from Odiel river (Southwest Spain). *Environ Int* 29:69-77
- 1.5- GÓMEZ-ARIZA JL *et al.* (1999) Metal readsorption and redistribution during the analytical fractionation of trace elements in oxic estuarine sediments. *Anal Chim Acta* 399:295-307
- 1.6- RAURET G (1998) Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment. *Talanta* 46:449-455
- 1.7- FANG T, LI X, ZHANG G (2005) Acid volatile sulfide and simultaneously extracted metals in the sediment cores of the Pearl River Estuary, South China. *Ecotox Environ Safe* 61:420-431
- 1.8- STEPHENS SR *et al.* (2001) Towards the characterisation of heavy metals in dredged canal sediments and an appreciation of 'availability': Two examples from the UK. *Environ Pollut* 113:395-401
- 1.9- SAHUQUILLO A, RIGOL A, RAURET G (2003) Overview of the use of leaching/extraction tests for risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *Trac-Trends Anal Chem* 22:152-159
- 1.10- CAMPOS E *et al.* (1998) A study of the analytical parameters important for the sequential extraction procedure using microwave heating for Pb, Zn and Cu in calcareous soils. *Anal Chim Acta* 369:235-243
- 1.11- SVETE P, MILAČIĆ R, PIHLAR B (2001) Partitioning of Zn, Pb and Cd in river sediments from a lead and zinc mining area using the BCR three-step sequential extraction procedure. *J Environ Monit* 3:586-590
- 1.12- MARIN B *et al.* (1997) Reproducibility testing of a sequential extraction scheme for the determination of trace metal speciation in a marine reference sediment by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 342:91-112
- 1.13- TESSIER A, CAMPBELL P. G. C, BISSON M (1979) Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Anal Chem* 51:844-851

- 
- 1.14- PÉREZ-CID B, LAVILLA I, BENDICHO C (1999) Application of microwave extraction for partitioning of heavy metals in sewage sludge. *Anal Chim Acta* 378:201-210
- 1.15- URE AM *et al.* (1993) Speciation of heavy metals in soils and sediments. An account of the improvement and harmonization of extraction techniques undertaken under auspices of the BCR of the Commission of the European Communities. *Int J Environ Anal Chem* 51:135-151
- 1.16- PUEYO M *et al.* (2001) Certification of the extractable contents of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in a freshwater sediment following a collaboratively tested and optimised three-step sequential extraction procedure. *J Environ Monit* 3:243-250
- 1.17- SAHUQUILLO A *et al.* (1999) Use of a certified reference material for extractable trace metals to assess sources of uncertainty in the BCR three-stage sequential extraction procedure. *Anal Chim Acta* 382:317-327
- 1.18- MOSSOP KF, DAVIDSON CM (2003) Comparison of original and modified BCR sequential extraction procedures for the fractionation of copper, iron, lead, manganese and zinc in soils and sediments. *Anal Chim Acta* 478:111-118
- 1.19- DAVIDSON CM *et al.* (2004) Should acid ammonium oxalate replace hydroxylammonium chloride in step 2 of the revised BCR sequential extraction protocol for soil and sediment? *Anal Chim Acta* 508:193-199
- 1.20- LEE JS *et al.* (2000) Influence of acid volatile sulfides and metal concentrations on metal partitioning in contaminated sediments. *Environ Sci Technol* 34:4511-4516
- 1.21- PENG SH *et al.* (2004) Metal partitioning in river sediments measured by sequential extraction and biomimetic approaches. *Chemosphere* 57:839-851
- 1.22- YU KC *et al.* (2001) Chemical binding of heavy metals in anoxic river sediments. *Wat Res* 35:4086-4094
- 1.23- CORREIA AD, COSTA MH (2000) Effects of sediment geochemical properties on the toxicity of copper-spiked sediments to the marine amphipod *Gammarus locusta*. *Sci Total Environ* 247:99-106
- 1.24- DAVIS A, ATKINS D (2001) Metal distribution in Clark Fork river sediments. *Environ Sci Technol* 35:3501-3506
- 1.25- QUEVAUVILLER P (2002) Operationally-defined extraction procedures for soil and sediment analysis. Part 3: New CRMs for trace-element extractable contents. *Trac-Trends Anal Chem* 21:774-785



- 1.26- QUEVAUVILLER P, RAURET G, GRIEPINK B (1993) Single and sequential extraction in sediments and soils. *Int J Environ Anal Chem* 51:231-235
- 1.27- LASORSA B, CASAS A (1996) A comparison of sample handling and analytical methods for determination of acid volatile sulfides in sediment. *Mar Chem* 52:211-220
- 1.28- MARGUÍ E *et al.* (2004) Comparison of three-stage sequential extraction and toxicity characteristic leaching tests to evaluate metal mobility in mining wastes. *Anal Chim Acta* 524:151-159
- 1.29- XIAO-QUAN S, BIN C (1993) Evaluation of sequential extraction for speciation of trace metals in model soil containing natural minerals and humic acid. *Anal Chem* 65:802-807
- 1.30- GAUTHREAUX K *et al.* (1998) Reliability and reproducibility of a sequential extraction procedure for trace metal determination in marsh sediments in Southwest Louisiana. *Microchem J* 60:175-183
- 1.31- ALLEN HE *et al.* (1991) *United States Environmental Protection Agency Report 821-R-91-100*. Washington DC
- 1.32- ALLEN HE, FU G, DENG B (1993) Analysis of acid-volatile sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for the estimation of potential toxicity in aquatic sediments. *Environ Toxicol Chem* 12:1441-1453
- 1.33- COLL A (2005) *Aplicació de la distribució i migració de radionúclids naturals i artificials a l'estudi dels processos erosius en conques hidrogràfiques catalanes* (tesi doctoral) Universitat Politècnica de Catalunya
- 1.34- BRANDVOLD LA *et al.* (1995) Distribution and partitioning of Copper, Lead and Zinc in stream sediments above and below an abandoned mining and milling area near Pecos, New Mexico, USA. *Analyst* 120:1485-1495
- 1.35- BARONA A, ARANGUIZ I, ELÍAS A (1999) Assessment of metal extraction, distribution and contamination in surface soils by a 3-step sequential extraction procedure. *Chemosphere* 39:1911-1922
- 1.36- IANNI C *et al.* (2001) Evaluation and Comparison of two selective extraction procedures for heavy metal speciation in sediments. *Anal Sci* 17:1273-1278



## **CAPÍTOL 2**

**Caracterització dels residus de  
mineria i relacions amb la  
contaminació per metalls en els  
sediments del mar Menor**



## 2.1. INTRODUCCIÓ

Per avaluar el risc ambiental que suposen certs residus o sediments és essencial tenir informació de la mobilitat dels metalls en aquests; no és suficient conèixer el contingut de metall total. La mobilitat està fortament influenciada per les característiques del residu o sediment i per les condicions ambientals que poden portar al transport, com acidificació, processos redox o règim de temperatura i d'aigua [2.1].

Hem utilitzat diferents aproximacions per descriure la mobilitat de metalls en sòls, sediments i residus. L'aproximació més fàcil i, per tant, més utilitzada per avaluar la mobilitat són els test d'extracció. Aquests experiments han estat dissenyats per investigar l'especiació metàl·lica, que governa la mobilitat [2.2]. Les fraccions fàcilment solubles, que són biodisponibles, i les més mòbils s'estudien normalment per processos d'extracció simple, que es duen a terme de manera ràpida i per provar el compliment de la legislació o de les normes. En canvi, el fraccionament, que permet diferenciar entre els components fàcilment i escassament solubles, s'estudia per procediments d'extracció seqüencial, que són més complicats que els processos d'extracció simple però ens proporcionen més informació [2.1, 2.3]. Algunes regulacions utilitzen els resultats de tests de lixiviació per avaluar el risc potencial per al medi ambient i per a la salut associat a un material determinat [2.4, 2.5].

En aquest sentit, el Consell Regulador dels Residus de Catalunya utilitza els resultats de l'aplicació del test de lixiviació alemany DIN 38414-S4 com a criteri d'acceptació per a la disposició d'un residu en un abocador municipal. Aquest test diferencia entre els constituents fàcilment solubles i els components poc solubles que necessitaran una segona o una tercera extracció [2.5]. D'aquesta manera s'avalua el nivell de perillositat de cada residu objecte d'estudi.

D'altra banda, l'esquema d'extracció seqüencial BCR ens permet estudiar el fraccionament dels metalls en sòls, sediments i residus que són extrets seqüencialment per tres extractants diferents, cadascun amb més reactivitat que l'anterior. La filosofia dels procediments d'extracció seqüencial és que cada reactiu dissoldrà components diferents, de manera que a partir de l'estudi del fraccionament dels metalls podem obtenir informació sobre la mobilitat, el destí o la biodisponibilitat dels metalls estudiats o avaluar el perill

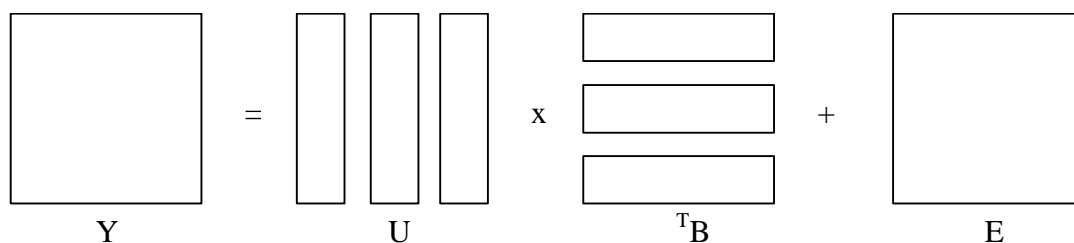
potencial que les mostres impliquen per al medi ambient. Els resultats que es deriven de l'aplicació d'esquemes d'extracció seqüencial s'analitzen generalment de manera univariant, és a dir, metall a metall o mostra a mostra. L'anàlisi de les dades a través de models d'anàlisi univariant permet obtenir informació sobre els continguts dels constituents individualment i comparar-los amb els valors òptims, intervals predeterminats, però no permet la completa avaluació de la qualitat de les mostres, que depèn de totes les variables observades i que haurien de ser considerades de manera simultània [2.6]. Els mètodes quimiomètrics ens poden ajudar a interpretar aquests resultats i arribar a correlacionar paràmetres, la qual cosa, sense aquestes eines, ens resultaria impossible [2.7, 2.8].

La quimiometria és la disciplina que utilitza mètodes matemàtics i estadístics per obtenir informació rellevant de les dades [2.9]. Actualment, els mètodes quimiomètrics han esdevingut una part integral dels estudis ambientals. Particularment, l'anàlisi per components principals (PCA) s'ha utilitzat sovint per caracteritzar matrius ambientals, definir-ne la qualitat i identificar diverses fonts de contaminació. L'anàlisi per components principals i/o l'anàlisi discriminant s'han aplicat també a l'estudi de les relacions de la resposta tòxica a la composició química de diferents matrius ambientals. El PCA s'utilitza per aconseguir una reducció de dimensionalitat, és a dir, per reduir el nombre de variables [2.6]. L'anàlisi per components principals és probablement la tècnica quimiomètrica multivariant més estesa, i, per la importància de les mesures multivariants en química, és reconeguda com la tècnica que ha canviat més significativament el punt de vista dels químics en l'anàlisi de dades [2.10].

El PCA permet trobar una sèrie de tendències, correlacions o estructures no aparents en una taula de dades, ja que busca les variables latents (combinacions lineals de les variables inicials) en un nombre que acostuma a ser inferior al de les variables primitives [2.6, 2.11, 2.12]. És a dir, és un mètode de reducció de dades; el seu objectiu principal és proporcionar una visualització fàcil de les relacions presents entre objectes o variables en una complexa estructura de dades com les que trobem en estudis de fraccionament [2.7, 2.8, 2.13]. Les tècniques d'anàlisi de dades multivariants es poden utilitzar per avaluar els processos ecotoxicològics complexos i mostrar les relacions i dependències entre les variables i els seus pesos relatius. En particular, el PCA s'ha utilitzat àmpliament en ecotoxicologia, ja que proporciona la informació més rellevant

sobre l'estructura de les dades multivariants i les relacions entre els objectes considerats per a una visió general del problema. També permet obtenir informació del comportament de les diferents variables, i indica aquelles que estan estrictament correlacionades i ens donen la mateixa informació [2.12].

La formulació matemàtica del problema és senzilla si es recorre a la notació matricial. D'aquesta manera, suposem que tenim una matriu  $Y$  obtinguda mesurant els valors de  $n_{var}$  variables en  $n_{obj}$  objectes, que dóna una matriu de dades en dues dimensions ( $n_{obj} \times n_{var}$ ). El nostre objectiu és dividir la variància present en  $Y$  en una part  $B$  atribuïble a les variables, una part  $U$  atribuïble als objectes i una part  $E$  residual:



Els paràmetres de  $B$  s'anomenen càrregues (*loadings*) i els components de  $U$  s'anomenen puntuacions (*scores*). Aquestes noves variables han de complir tres condicions: el nou nombre de variables ha de ser com més petit millor, no han d'estar correlacionades entre si, és a dir, han de ser ortogonals, i han d'explicar la major part de la variància de les dades originals [2.11, 2.14, 2.15].

El PCA en dues dimensions permet extreure informació útil, no disponible a primera vista, sobre les relacions presents entre objectes i/o variables estudiats, i es pot considerar, actualment, com una tècnica de rutina en estudis ambientals multivariants. En el cas de dades amb estructura multidimensional, com és el cas d'estudis d'especiació (espai, variables, espècies, mida de partícula), es requereixen mètodes d'anàlisi multidimensionals per explorar i extreure la informació amagada sobre l'estructura de les dades i les relacions existents. Entre aquests mètodes, l'anàlisi per components (principals) multidimensional (MPCA) està emergint amb gran potencial. És una extensió del PCA a ordres majors i està dissenyat per tractar amb dades multidimensionals; es basa en el mètode clàssic PCA desenvolupat sobre la matriu de dades desplegada sota la restricció d'ortogonalitat. D'altra banda, també podem tractar les dades multidimensionals amb els models PARAFAC i Tucker, que generalment no es troben restringits per la condició

d'ortogonalitat. Aquests mètodes, a diferència de l'MPCA, són mètodes jeràrquics, ja que els seus paràmetres canvien quan es calculen diferents nombres de components [2.7, 2.8, 2.10, 2.13].

PARAFAC és un mètode multidimensional que es pot aplicar a dades multidimensionals, és a dir, les dades es poden arranjar en un cub en comptes d'una matriu com en els mètodes multivariants estàndard. Podem considerar PARAFAC com una versió restringida de Tucker i Tucker, al seu torn, com una versió restringida de PCA en dues dimensions. D'aquesta manera, qualsevol estructura que pugui ser modelitzada adequadament mitjançant el model PARAFAC podrà ser modelitzada per Tucker o PCA en dues dimensions, però PARAFAC utilitza menys graus de llibertat. Generalment, preferim utilitzar el model més simple possible i, si ens basem en l'ús dels graus de llibertat, el model PCA es pot considerar el model més complex i flexible, mentre que PARAFAC és el més simple i restringit. PARAFAC és un mètode de descomposició que, conceptualment, es pot comparar al PCA. La descomposició de les dades es realitza en components trilinears: en comptes de descompondre en un vector de càrregues i en un de puntuacions, com amb el PCA, cada component consisteix en un vector de puntuacions i dos vectors de càrregues. És comú no distingir entre càrregues i puntuacions en mètodes tridimensionals, ja que es tracten de la mateixa manera numèricament [2.16].

L'objectiu d'aquest estudi és investigar la contaminació present a la zona d'estudi, tant pel que fa als sediments del mar Menor com als residus presents a la Sierra de Cartagena (que són l'origen de la contaminació). En aquest sentit, en primer lloc hem avaluat residus dels diferents tipus que es troben a la Sierra i que provenen de les diferents etapes del processament del mineral. S'ha aplicat sobre els diferents residus tant l'esquema d'extracció seqüencial BCR com el test de lixiviació DIN per veure quins residus presenten més problemàtica ambiental. En una segona etapa s'ha realitzat un estudi més ampli aplicant l'esquema d'extracció seqüencial sobre mostres de diferent tipus, és a dir, diferents residus i sediments provinents del llit de les rambles i de la seva desembocadura al mar Menor. S'han utilitzat mètodes d'anàlisi multivariant per avaluar amb més profunditat l'estructura de les dades i estudiar les possibles relacions existents.

## 2.2. EXPERIMENTAL

### 2.2.1. Equips i reactius

S'ha utilitzat un ICP-OES (Liberty RL, Varian) amb un nebulitzador de tipus en V per a la determinació de zinc, plom, cadmi, coure, níquel i arsènic. Les longituds d'ona de treball seleccionades van ser: Zn (202,551 nm), Pb (220,353 nm), Cd (214,438 nm), Cu (324,754 nm), Ni (221,647 nm) i As (193,696 nm).

Per a les digestions àcides de les mostres s'ha utilitzat un microones Milestone ETHOS PLUS (Gomensoro, SA) amb control de temperatura i reactors de tefló PFA. S'ha emprat una centrífuga Mixtasel P-Selecta per a la separació dels extractes. Per mantenir les mostres agitadaes durant les extraccions s'ha utilitzat un agitador rotatori Dinko. Per a la mesura i l'ajust del pH, quan es requeria, s'ha fet servir un pH-metre GLP22 (Crison).

Tots els reactius utilitzats són de qualitat per a anàlisi o suprapurs. Les solucions extractants necessàries per al procediment BCR es preparen a partir de reactius de qualitat per a anàlisi (l'àcid acètic, el peròxid d'hidrogen, l'àcid clorhídric i el clorur d'hidroxilamina són de Sigma-Aldrich (Steinheim), l'acetat d'amoni de Riedel-deHäen, l'acetat de sodi de Fluka). Els patrons dels metalls es preparen per dilució de les solucions estoc ( $1.000 \text{ mg L}^{-1}$ ) de cada element (Spectrascan), i s'utilitzen patrons diferents per a cada medi extractant.

### 2.2.2. Procediment experimental

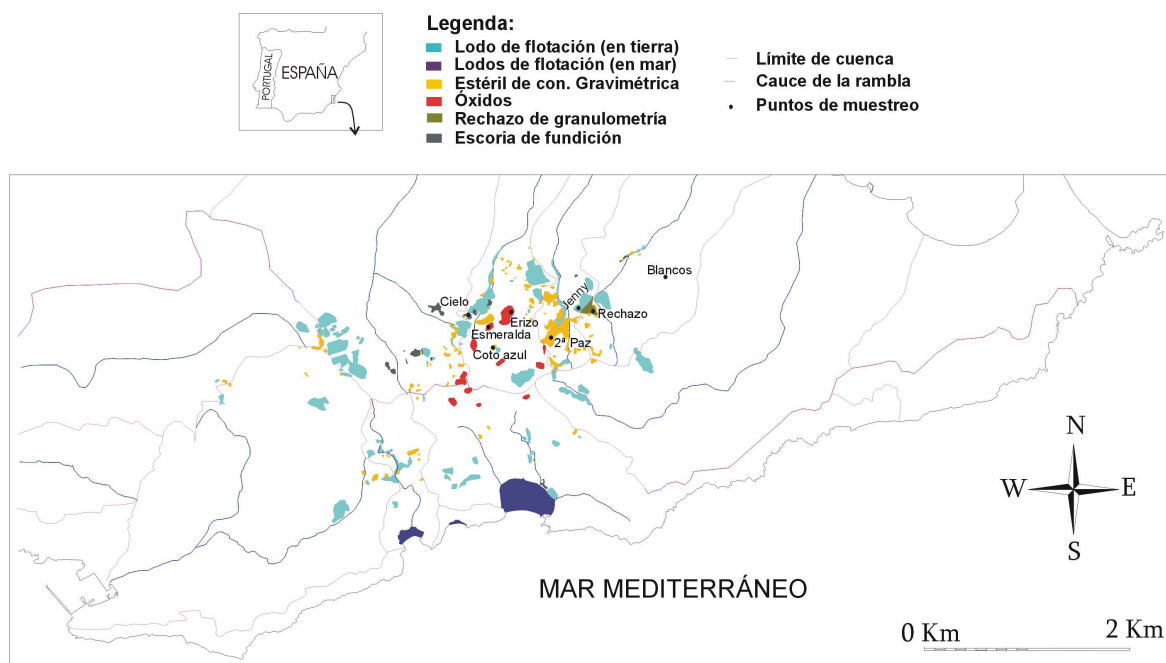
#### 2.2.2.1. Presa de mostres

S'han estudiat mostres de diferent tipologia procedents de les conques hidrogràfiques de les tres rambles estudiades (Beal, Ponce i Carrasquilla), en cadascuna de les quals s'han recollit mostres de residus de diferents característiques (depenent del procés metal·lúrgic que ha rebut), sediment del llit de les rambles i sediment del mar Menor a la desembocadura de les rambles. La localització geogràfica de les diferents mostres estudiades es pot observar a les **figures 2.1 i 2.2**.

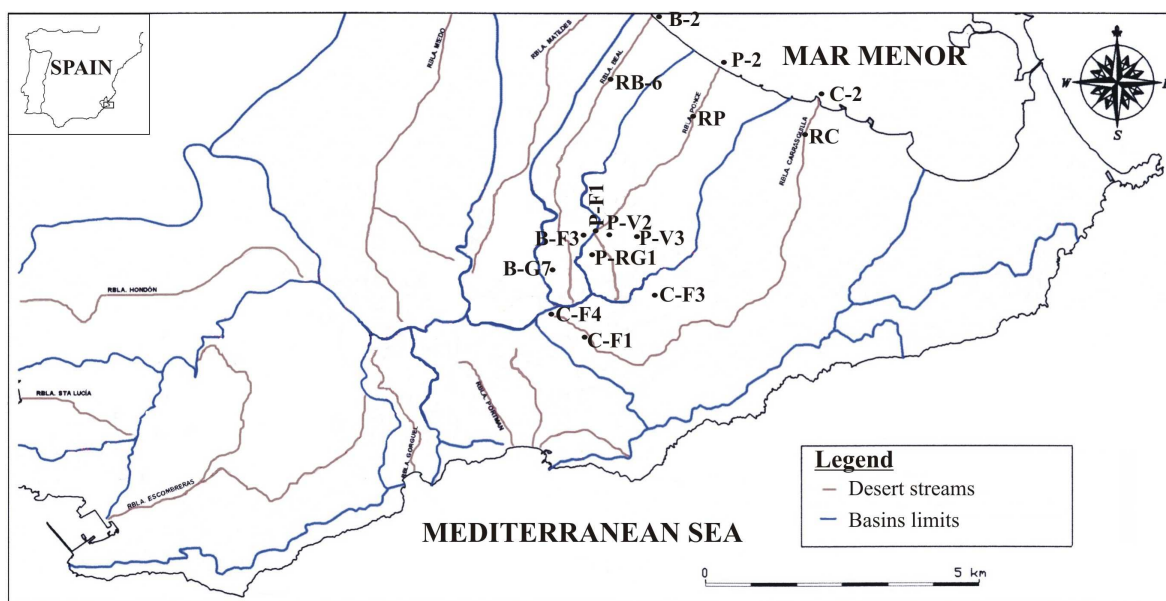
Les mostres s'han recollit utilitzant pales de polipropilè i transferint-les a bosses del mateix material. Un cop al laboratori, s'han assecat a temperatura ambient i s'han tamisat per obtenir les fraccions corresponents a mida de partícula inferior a 500 i a 63  $\mu\text{m}$ .



L'estudi desenvolupat en la primera part del capítol sobre residus de diferent tipologia s'ha realitzat utilitzant la fracció amb una mida de partícula inferior a  $500 \mu\text{m}$ , mentre que en la segona part, en què s'utilitza l'anàlisi multivariant per estudiar els resultats obtinguts de l'aplicació de l'esquema d'extracció seqüencial sobre mostres de residus i sediments, s'han estudiat les dues fraccions (corresponents a mida de partícula inferior a  $500 \mu\text{m}$  i a  $63 \mu\text{m}$ ).



**Figura 2.1.** Localització geogràfica dels diferents tipus de residus.



**Figura 2.2.** Localització geogràfica de les diferents mostres avaluades.

### 2.2.2.2. *Extraccions simples i seqüencials*

El mètode d'extracció simple DIN 38414-S4 ens permet obtenir informació sobre el comportament d'un residu sòlid quan es posa en contacte amb aigua. Per tant, en aquest mètode d'extracció s'utilitza aigua Mili-Q com a agent extractant, i s'ha seguit el protocol que marca la norma alemanya [2.17]. En primer lloc, si la mostra té una mida de partícula superior a 10 mm s'ha de realitzar una mòlta per reduir aquesta mida. L'extracció es realitza a temperatura ambient durant 24 hores utilitzant una relació sòlid-líquid 1:10. Un cop acabat el període d'extracció, se separa el residu no dissolt per filtració, utilitzant un filtre de membrana amb una mida de porus de 0,45 µm. Finalment, es mesura el pH, la conductivitat i la concentració de metalls en l'extracte. Hem repetit el procés d'extracció tres vegades per tal de simular millor les condicions reals, en les quals el residu pot entrar en contacte diverses vegades amb pluja o aigua subterrània.

Els detalls del protocol d'extracció seqüencial seguit (BCR) es troben en l'**apartat 1.2.2.2** i en la **figura 1.2**.

### 2.2.2.3. *Anàlisi estadística*

L'anàlisi de dades té un paper important en la química ambiental. Normalment els objectes d'interès (mostres) es descriuen mitjançant diferents tipus de paràmetres (variables). L'anàlisi de dades exploratòria s'aplica per obtenir informació sobre la similitud entre mostres i les relacions entre variables. En aquesta etapa de l'anàlisi de dades és important aconseguir una bona representació visual de les dades. En aquest estudi, el tractament de dades estadístic s'ha realitzat mitjançant MATLAB 7.0.4 i la PLS-toolbox per a MATLAB, amb l'objectiu d'identificar un patró de reconeixement en les mostres objecte d'estudi.

#### 2.2.2.3.1. *Anàlisi per components principals en dues dimensions*

L'anàlisi per components principals (PCA) assumeix un model bilineal per explicar la variància observada en les dades utilitzant un nombre reduït de components [2.10]:

$$d_{ij} = \sum_{n=1}^N u_{in} v_{jn} + e_{ij} \quad (\text{Eq. 2.1})$$

on  $d_{ij}$  és una dada experimental de la matriu (mesura de la concentració d'un metall) de la fila  $i$  (una mostra particular) i de la columna  $j$  (variable o metall considerat),  $u_{in}$  és la puntuació corresponent de l'element  $n$  per a la mostra  $i$ , i  $v_{jn}$  és la càrrega corresponent a l'element  $n$  per a la variable  $j$ . El model bilineal de l'**equació 2.1** assumeix que les concentracions de metall mesurades a cada mostra,  $d_{ij}$ , són la suma d'un nombre reduït ( $N$ ) de contribucions independents més una part residual,  $e_{ij}$ , no modelitzada. Cadascuna d'aquestes contribucions es descriu pel producte de dos elements, un que dóna la informació sobre la contribució del component a la mostra considerada (fila) o puntuació (*score*), i l'altre que dóna la informació sobre la composició del component en la variable considerada o càrrega (*loading*). El nombre de components ( $N$ ) s'escull tan petit com sigui possible, però que permeti l'explicació de la màxima variància per al model [2.7, 2.15, 2.18].

L'anàlisi per components principals s'aplica sobre les dades autoescalades, de manera que les variables autoescalades ( $z_{ij}$ ) corresponents a les variables mesurades ( $d_{ij}$ ) s'expressen com a:

$$z_{ij} = \frac{d_{ij} - d_m}{\sigma} \quad (\text{Eq. 2.2})$$

on  $d_m$  i  $\sigma$  representen la mitjana i la desviació estàndard, respectivament. L'autoescalat ens proporciona variables amb mitjana 0 i variància 1. D'aquesta manera minimitzem la influència de la diferència de variància entre les variables, així com la diferència d'unitats de mesura, ja que en autoescalar obtenim una matriu adimensional [2.10, 2.13].

### 2.2.2.3.2. Anàlisi per components principals en tres dimensions: PARAFAC

L'anàlisi en tres dimensions de les dades que tenen una estructura d'aquest tipus ens permet obtenir informació amb més profunditat i més rellevant per a la interpretació dels resultats. El model PARAFAC (*parallel factor analysis*) descompon la matriu de dades tridimensional  $X$  ( $I \times J \times K$ ) en tres matrius de càrregues,  $A$  ( $I \times F$ ),  $B$  ( $J \times F$ ) i  $C$  ( $K \times F$ ), segons Bro [2.16]:

$$x_{ijk} = \sum_{f=1}^F a_{if} b_{jf} c_{kf} + e_{ijk} \quad (\text{Eq. 2.3})$$

on  $x_{ijk}$  és la matriu de dades autoescalada;  $a_{if}$ ,  $b_{jf}$  i  $c_{kf}$  són els elements de les tres matrius de càrregues, A, B, i C, i  $e_{ijk}$  és el terme d'error dels elements de la matriu de dades. El model PARAFAC és un model restringit amb el mateix nombre de factors, F, per a cada matriu de càrregues [2.13].

## 2.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 2.3.1. Avaluació del risc de diferents tipus de residus

#### 2.3.1.1. Tests de lixiviació

En aquesta part de l'estudi hem avaluat vuit residus de diferents tipus segons l'etapa del tractament del mineral de la qual procedeixen:

- Òxids (*gossan*) provinents de la cobertura dels jaciments de sulfurs.
- Estèril de gravimetria: material descartat dels processos de separació gravimètrica.
- Estèril de *corta*: material provinent de les tasques d'excavació i preparació de les *cortas*.
- Llots de flotació: residus procedents de rentadors de flotació diferencial.
- Estèril de granulometria: material descartat dels processos de separació granulomètrica.
- Escòries de fosa (*gacheros*): material resultant dels processos de fosa.

La norma DIN 38414-S4 és la que utilitza l'Agència de Residus de Catalunya per determinar el tipus de residu amb què ens trobem i com s'han de dipositar, és a dir, si han de ser abocats a un dipòsit controlat o no. S'ha realitzat el test de lixiviació en mostres representatives de diferents tipus de residus presents a l'àrea d'estudi — els resultats es troben a la **taula 2.1**. En general, s'observa que al llarg de les extraccions disminueix la conductivitat elèctrica i la concentració de metalls, mentre que el pH tendeix a augmentar. Això indica que aquests residus tenen un gran potencial per alliberar metalls, però que aquest potencial disminueix amb cada rentat.

Veiem que les concentracions de Cu i Ni són en tots els casos inferiors als nivells màxims permesos, per tant, aquests metalls no són problemàtics en aquests residus. Pel que fa a Pb, Zn i Cd, trobem algunes mostres que superen aquests nivells màxims permesos. En el cas de les mostres d'òxids, veiem que les concentracions de metalls extrems sempre són

inferiors als nivells màxims permesos, de manera que podem esperar que aquests tipus de residus no alliberin quantitats apreciables de metalls al medi. La resta de mostres presenten concentracions superiors als nivells màxims per a Pb o Zn i es considerarien perilloses. Destacaríem les mostres d'estèril de gravimetria, de *corta*, i els llots de flotació, que presenten concentracions de Cd superiors al nivell permès. La mostra d'estèril de *corta*, tot i que presenta elevades concentracions de Zn, no mostra lixiviació en Pb, probablement perquè la mena d'aquesta *corta* en particular era més rica en Zn.

**Taula 2.1.** Resultats de l'aplicació del test de lixiviació DIN 38414-S4 sobre les mostres dels residus miners estudiats, expressats com la mitjana de dos replicats.

Residu	Tipus	Extracció	pH	Conductivitat (mS cm <sup>-1</sup> )	Pb (mg L <sup>-1</sup> )	Zn (mg L <sup>-1</sup> )	Cd (mg L <sup>-1</sup> )	Cu (mg L <sup>-1</sup> )	Ni (mg L <sup>-1</sup> )
Esmeralda	Òxids	1	7,51	1,34	<0,4	<0,1	<0,05	<0,1	<0,4
		2	7,79	0,51	<0,4	<0,1	<0,05	<0,1	<0,4
		3	8,04	0,18	<0,4	<0,1	<0,05	<0,1	<0,4
Erizo	Òxids	1	6,54	0,48	<0,4	1,71	<0,05	<0,1	<0,4
		2	6,66	0,22	<0,4	0,77	<0,05	<0,1	<0,4
		3	6,60	0,14	<0,4	0,46	<0,05	<0,1	<0,4
Azul	Estèril gravimetria	1	3,24	1,40	2,15	26,36	0,15	<0,1	<0,4
		2	3,39	0,43	3,32	4,30	<0,05	<0,1	<0,4
		3	3,40	0,28	5,11	2,06	<0,05	<0,1	<0,4
Paz	Estèril gravimetria	1	4,43	4,76	2,46	299,3	1,96	0,13	<0,4
		2	4,66	1,46	2,57	49,24	0,37	<0,1	<0,4
		3	4,67	0,48	3,61	13,87	0,12	<0,1	<0,4
Blancos	Estèril <i>corta</i>	1	6,09	2,60	<0,4	68,95	0,81	<0,1	<0,4
		2	6,61	0,67	<0,4	5,40	<0,05	<0,1	<0,4
		3	7,07	0,25	<0,4	0,62	<0,05	<0,1	<0,4
Jenny	Llots flotació	1	6,01	2,94	2,29	108,5	0,57	<0,1	<0,4
		2	6,15	2,32	1,68	32,31	0,17	<0,1	<0,4
		3	6,28	0,75	<0,4	9,99	<0,05	<0,1	<0,4
Rechazo	Estèril granulometria	1	1,10	26,40	2,56	14,11	0,07	<0,1	<0,4
		2	1,05	24,40	2,28	2,24	<0,05	<0,1	<0,4
		3	1,39	9,47	2,30	0,94	<0,05	<0,1	<0,4
Cielo	Escòries fosa	1	5,12	0,15	7,74	10,53	<0,05	<0,1	<0,4
		2	5,42	0,03	4,32	2,32	<0,05	<0,1	<0,4
		3	5,52	0,02	3,02	1,10	<0,05	<0,1	<0,4
<b>Valor límit [2.19]</b>			<b>4-13</b>	<b>50</b>	<b>1</b>	<b>5</b>	<b>0,2</b>	<b>5</b>	<b>1</b>

D'altra banda, també es veu una relació entre el pH dels residus i la concentració de metalls extreta; d'aquesta manera, els extractes de residus amb un pH bàsic presenten concentracions de metalls per sota dels nivells màxims permesos (coincidint amb els residus corresponents a òxids), mentre que els extractes de residus amb un pH àcid presenten concentracions de metalls per sobre dels nivells màxims permesos, i es consideren residus perillosos.

### 2.3.1.2. *Fraccionament dels metalls*

Sobre aquests mateixos residus s'ha aplicat el procediment d'extracció seqüencial proposat pel BCR. En podem veure els resultats a la **figura 2.3**. Observem un comportament similar per a Zn i Cd molt diferent del de Pb, el que ja havíem vist en el cas dels sediments del mar Menor (vegeu el **capítol 1**).

Pel que fa al comportament individual dels residus, observem que la mobilitat de Zn i Cd és major en els residus de Paz, Blancos i Jenny, corresponents a estèrils de gravimetria, de *corta* i de llots de flotació, respectivament. En el cas de Pb, la mobilitat és major en els residus d'Erizo, Esmeralda, Cielo i Rechazo, corresponents a òxids, escòries de fosa i estèril de granulometria, respectivament.

En el cas dels residus que presenten una major mobilitat de Zn i Cd, els resultats són similars als obtinguts mitjançant el test de lixiviació. És a dir, els residus de Paz Blancos i Jenny, que presenten major mobilitat de Zn i Cd segons els resultats obtinguts de l'aplicació de l'esquema BCR, són els que presenten majors concentracions de Zn i Cd en el test de lixiviació. De fet, són els únics que presenten una concentració de Cd superior al valor límit. Si avaluem la mobilitat del Pb, els resultats entre els dos procediments es contradiuen més significativament. Segons els resultats de l'aplicació de l'esquema BCR, el Pb presenta una major mobilitat en els residus Cielo i Rechazo, pels quals s'ha obtingut també una concentració de Pb lixiviat per sobre del nivell màxim permès, juntament amb altres residus com són Azul, Paz, Jenny i Rechazo, que no presenten una mobilitat gran del Pb segons els resultats de l'aplicació de l'esquema BCR.

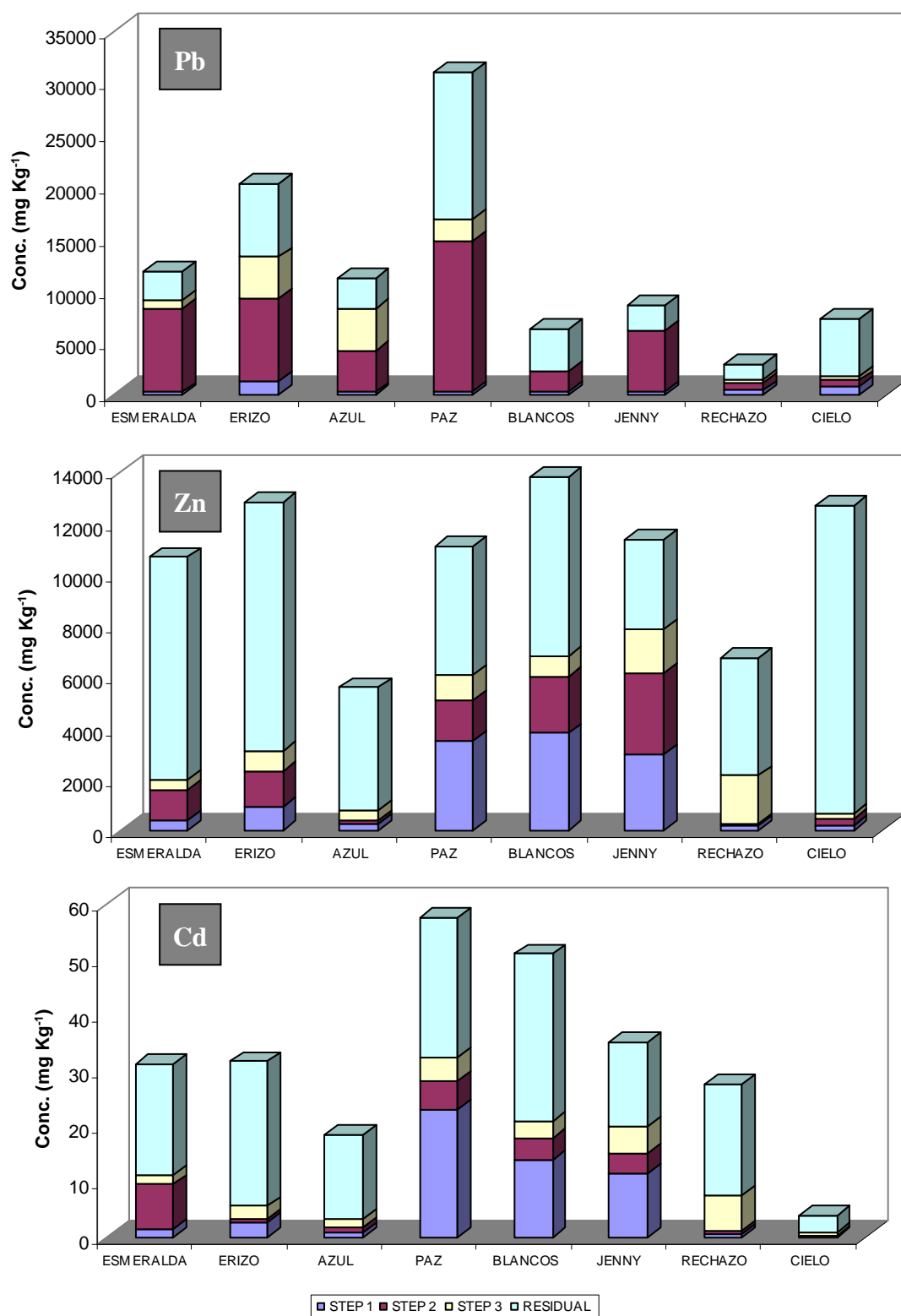


Figura 2.3. Resultats obtinguts de l'aplicació del procediment d'extracció seqüencial proposat pel BCR per a Pb, Zn i Cd sobre les mostres dels diferents tipus de residus.

En canvi, segons els resultats de l'aplicació de l'esquema BCR, els residus corresponents a òxids (Esmeralda i Erizo) presenten certa mobilitat dels metalls avaluats, la qual cosa es contradiu amb les conclusions que dibuixàvem veient els resultats de l'aplicació del test de lixiviació DIN 38414-S4, en el qual presenten concentracions inferiors als nivells màxims permesos en tots els metalls avaluats. D'aquesta manera veiem que els resultats de l'aplicació dels dos esquemes d'extracció no es corresponen, probablement perquè l'extracció en el test DIN està dominada pel pH del residu i en el cas de l'esquema BCR no és així.

També veiem que el fet que els residus vinguin del mateix tractament no implica que presentin un mateix comportament, de manera que podem suposar que la major o menor mobilitat no està determinada només pel tractament al qual han estat sotmesos, sinó també per l'estructura mineral de la qual provenen. És per aquest motiu que s'opta per investigar si existeixen relacions entre els residus que provenen d'una mateixa conca hidrogràfica; també s'estudia la relació entre els residus presents a la Sierra Minera i els sediments presents al mar Menor, que, com hem comentat, provenen d'aquests residus.

Per investigar aquestes relacions utilitzarem eines d'anàlisi de dades multivariants que són útils en el cas de treballar amb un gran nombre de dades per poder veure un patró de comportament en les mostres objecte d'estudi.

### **2.3.2. Interpretació del fraccionament de metalls en residus i sediments mitjançant tècniques d'anàlisi multivariant**

En aquesta segona etapa de l'estudi hem utilitzat mostres de residus i de sediments, tant del llit de les rambles com de la seva desembocadura al mar Menor. Les mostres estan codificades seguint l'ordre següent: inicial de la conca hidrogràfica de la qual provenen (Beal, Ponce i Carrasquilla), de manera que les mostres de Ponce comencen el seu codi per una P, seguida d'un guió i el tipus de mostra del qual parlem: SM, sediment del mar Menor a la desembocadura de la rambla; SR, sediment del llit de la rambla, i la resta corresponen al tipus de residu segons el tractament que l'ha generat (V, RG, F i G, que corresponen a estèrils de *corta*, estèril de granulometria, llots de flotació i estèril de gravimetria, respectivament). El nombre que pot acompanyar el codi identifica la bassa o punt de mostreig a què ens referim. La localització geogràfica d'aquestes mostres es pot veure a la **figura 2.2**. L'esquema BCR s'ha aplicat a les fraccions de les mostres amb una mida de



partícula inferior a 500 i a 63  $\mu\text{m}$ . De l'aplicació de l'esquema BCR obtenim una gran quantitat de dades, que fa que sigui difícil avaluar-les i trobar-hi relacions o determinar la seva estructura. Per aquest motiu es decideix recórrer a l'aplicació de mètodes quimiomètrics. Per utilitzar aquests mètodes necessitem tenir les dades en forma matricial, és a dir, les mostres ordenades en files i els metalls (variables) en columnes. Seguint aquesta nomenclatura obtenim, de l'aplicació del BCR, una matriu de dades de cada etapa i podem avaluar-ne els resultats cercant una estructura i relacions entre les mostres.

### 2.3.3. Tractament estadístic de les dades

#### 2.3.3.1. Anàlisi per components principals de la primera etapa del BCR

Els resultats de l'aplicació del procediment BCR, per a la primera etapa, es mostren a la **taula 2.2**. Com podem observar, les concentracions de Zn són més elevades que les de la resta de metalls determinats. Principalment per a les mostres B-G7, P-V3, C-F4, C-F3 i P-V2 (mostres de residus provinents de les tres conques estudiades), que també contenen les concentracions més elevades de Cd. Les concentracions de Cu i Ni són baixes en totes les mostres; cal destacar les mostres de B-F3 i P-G9, que presenten concentracions elevades d'aquests dos metalls comparades amb les altres mostres. També és remarcable la mostra RP (sediment de la rambla de Ponce), que presenta la concentració més elevada de Pb.

Es realitza l'anàlisi per components principals sobre aquesta matriu autoescalada. A la **taula 2.3** podem veure els components principals (autovalor superior a 1) i la variància explicada pel model. A la **figura 2.4** podem veure el diagrama doble (*biplot*) dels dos components principals obtinguts en el model. El diagrama doble s'obté superposant els diagrames de puntuacions i de càrregues per a un mateix pla, i ens permet obtenir informació sobre els objectes i els grups formats per les variables, de manera que podem extreure conclusions sobre les relacions entre els objectes i les variables fonamentals [2.20].

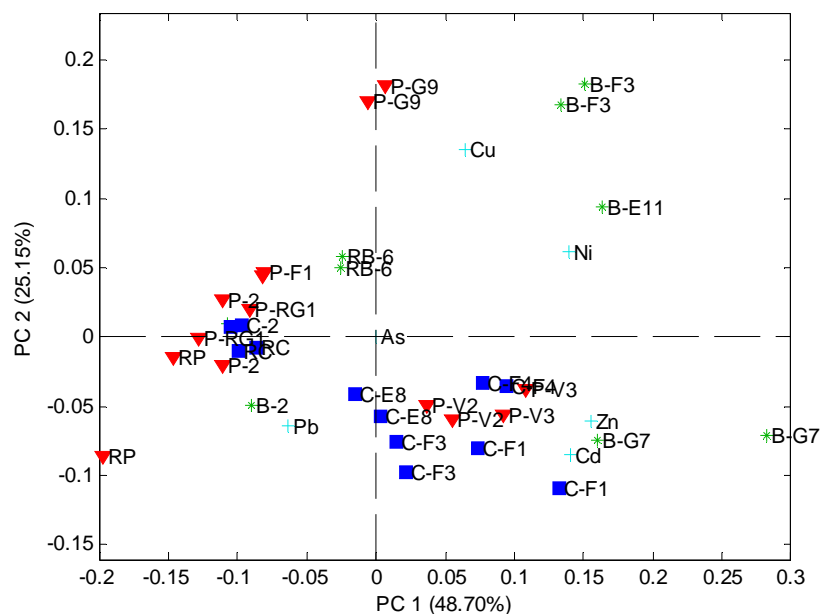
**Taula 2.2.** Resultats de la primera etapa del BCR en les diferents mostres estudiades.

	FRACCIÓ	Pb	Zn	Cd	Cu	Ni	As
P-SM	500	33	50	0,8	0,5	0,5	0,5
P-SM	63	571	650	3,1	7,2	0,5	0,5
B-SM	500	140	370	1,2	0,5	0,5	0,5
B-SM	63	660	1.320	3,2	2,8	1,1	0,5
C-SM	500	140	310	2,0	0,5	0,5	0,5
C-SM	63	100	260	3,2	0,9	0,5	0,5
B-G7	500	130	3.580	22,6	6,2	3,1	0,5
B-G7	63	115	5.500	24,0	7,2	5,6	0,5
P-V3	500	198	3.600	12,8	3,9	2,6	0,5
P-V3	63	150	3.600	12,6	5,1	3,1	0,5
P-RG1	500	300	160	0,6	0,5	0,5	0,5
P-RG1	63	390	276	1,2	4,0	2,0	0,5
B-F3	500	200	2.470	10,1	50,0	4,5	0,5
B-F3	63	213	2.340	9,8	46,7	4,2	0,5
C-F4	500	148	3.070	13,4	4,8	3,0	0,5
C-F4	63	161	2.950	12,0	4,4	2,8	0,5
C-E8	500	53	1.710	14,0	0,5	0,5	0,5
C-E8	63	40	1.640	10,6	0,5	0,5	0,5
C-F1	500	222	2.130	19,9	0,9	2,3	0,5
C-F1	63	198	2.890	25,4	1,1	2,6	0,5
C-F3	500	451	2.460	13,0	5,4	1,2	0,5
C-F3	63	520	2.490	15,7	5,1	1,1	0,5
P-V2	500	178	2.460	11,2	0,5	2,1	0,5
P-V2	63	194	2.970	11,8	0,6	2,2	0,5
P-F1	500	6	170	0,5	0,5	1,6	0,5
P-F1	63	6	134	0,5	0,5	1,8	0,5
B-E11	500	96	2.190	8,5	10,7	7,9	0,5
P-G9	500	3	420	1,1	29,8	2,8	0,5
P-G9	63	5	520	1,7	33,3	2,9	0,5
RB-6	500	195	830	3,1	8,0	2,9	0,5
RB-6	63	157	809	3,2	9,4	2,7	0,5
RP	500	490	4	0,5	1,0	0,5	0,5
RP	63	1.200	15	0,5	1,1	0,5	0,5
RC	500	220	500	3,3	0,5	0,5	0,5
RC	63	193	457	5,1	2,0	0,5	0,5

El primer component principal conté un 48,7 % de la variància de les dades originals, i veiem que té càrregues positives per a Zn, Cd, Cu i Ni i càrregues negatives per a Pb. El segon component conté un 25,15 % de la variància i té càrregues positives per a Cu i Ni i càrregues negatives per a Pb, Zn i Cd. D'aquesta manera, pel fet de tenir els dos components en un mateix pla, veiem que les mostres que ens quedin en el primer quadrant (puntuacions positives per als dos components) presentaran elevades concentracions de Cu i Ni. Podem destacar les mostres B-F3, P-G9 i B-E11. De manera similar, les mostres que es troben en el tercer quadrant presenten elevades concentracions de Pb. En aquest cas destaquem la mostra RP. I, finalment, les mostres en el quart quadrant tindran concentracions elevades de Zn i Cd, i destaquem la majoria de mostres provinents de la rambla de Carrasquilla i les mostres de residus B-G7, P-V2 i P-V3.

**Taula 2.3.** Variància explicada pel model de components principals aplicat als resultats de la primera etapa del BCR.

Component principal	Autovalor	% Variància explicada	% Variància acumulada
1	2,44	48,70	48,70
2	1,26	25,15	73,85

**Figura 2.4.** Biplot dels dos components principals resultants de l'aplicació de l'anàlisi per components principals sobre els resultats de la primera etapa del BCR.

Podem veure una lleugera diferenciació de les mostres provinents de les diferents conques hidrogràfiques, encara que sovint es veuen barrejades les unes amb les altres.

### 2.3.3.2. Anàlisi per components principals de la segona etapa del BCR

Els resultats de l'aplicació del BCR, per a la segona etapa, es mostren a la **taula 2.4**. En aquesta etapa, les concentracions de Pb i Zn són molt elevades. Destaquem les mostres provinents de la conca de Beal, B-G7 i RB-6, que presenten les concentracions de Pb més elevades (trobem concentracions al voltant dels 20.000 mg kg<sup>-1</sup> per a aquestes mostres). D'altra banda, la mostra C-E8 és la que presenta majors concentracions de Zn, Cd i Ni.

**Taula 2.4.** Resultats de la segona etapa del BCR en les diferents mostres estudiades.

	FRACCIÓ	Pb	Zn	Cd	Cu	Ni	As
P-SM	500	80	34	0,5	0,5	0,5	0,5
P-SM	63	560	710	0,5	3,0	0,5	0,5
B-SM	500	2.000	2.100	1,5	5,7	2,9	0,5
B-SM	63	3.580	2.230	0,8	18,0	3,7	0,5
C-SM	500	1.100	1.400	5,0	0,5	0,5	0,5
C-SM	63	1.200	1.200	3,9	7,0	2,4	0,5
B-G7	500	14.500	1.250	4,6	17,2	1,3	0,5
B-G7	63	22.100	1.600	4,1	23,0	1,7	0,5
P-V3	500	3.000	2.500	4,9	5,6	2,6	0,5
P-V3	63	2.500	2.290	3,4	8,0	2,2	0,5
P-RG1	500	800	62	0,5	0,6	0,5	0,5
P-RG1	63	2.070	164	0,9	2,8	0,5	0,5
B-F3	500	5.000	1.940	3,6	14,0	1,1	0,5
B-F3	63	4.200	1.800	3,3	12,1	0,8	0,5
C-F4	500	3.750	1.618	7,7	9,9	1,6	0,5
C-F4	63	7.727	1.810	6,7	11,0	2,1	0,5
C-E8	500	7.750	6.200	23,3	20,0	7,3	0,5
C-E8	63	7.700	5.300	154,0	17,5	6,6	0,5
C-F1	500	4.330	2.310	8,7	18,6	1,3	0,5
C-F1	63	6.340	3.360	12,1	23,3	2,2	0,5
C-F3	500	1.310	2.410	5,7	18,8	1,2	0,5
C-F3	63	1.650	3.310	7,3	16,8	2,1	0,5
P-V2	500	1.490	1.700	3,7	5,2	1,9	0,5
P-V2	63	1.390	2.330	3,9	6,4	2,0	0,5
P-F1	500	272	92	0,8	0,8	0,5	0,5
P-F1	63	424	98	0,5	1,5	0,5	0,5
B-E11	500	2.600	122	0,8	16,3	0,5	0,5
P-G9	500	3.240	300	1,3	21,2	0,5	0,5
P-G9	63	3.970	328	1,8	29,3	0,5	0,5
RB-6	500	5.000	424	1,8	15,4	0,5	0,5
RB-6	63	21.500	500	1,7	17,6	0,5	0,5
RP	500	1.380	68	0,5	2,0	0,5	0,5
RP	63	269	300	0,8	4,5	2,0	0,5
RC	500	1.100	1.400	3,0	0,5	0,5	0,5
RC	63	1.560	1.440	3,4	6,3	2,4	0,5

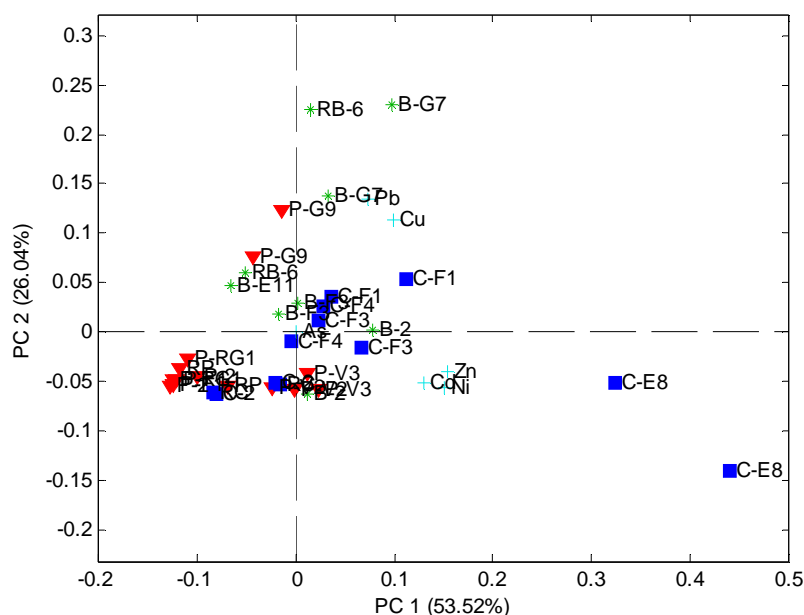
A partir de l'anàlisi per components principals sobre aquesta matriu autoescalada obtenim els resultats que es mostren a la **taula 2.5**. Tenim dos components que podem considerar significatius i expliquen un 79,55 % de la variància de la matriu original.

**Taula 2.5.** Variància explicada pel model de components principals aplicat als resultats de la segona etapa del BCR.

Component principal	Autovalor	% Variància explicada	% Variància acumulada
1	2,68	53,52	53,52
2	1,30	26,04	79,55

A la **figura 2.5** es mostra el diagrama doble d'aquests dos components principals. En aquest cas, el primer component principal (53,52 % de la variància) té càrregues positives per a tots els metalls, cosa que indica que les mostres que es troben més a la dreta del gràfic (puntuacions positives en el primer component) presenten concentracions més

elevades que les que es troben a la part esquerra (puntuacions negatives). El segon component, en canvi, té càrregues positives per a Pb i Cu i negatives per a Zn, Cd i Ni, la qual cosa indica que les mostres que es troben a la part superior del gràfic presenten concentracions elevades de Pb i Cu, mentre que les que es troben a la part inferior presenten concentracions elevades dels altres tres metalls. En el gràfic destaquem les mostres corresponents a B-G7 i RB-6 (ambdues provinents de la conca de Beal), que presenten elevades concentracions de Pb i Cu, i la mostra C-E8 (corresponent a un residu provinent de la conca de Carrasquilla), que presenta concentracions elevades de Zn, Cd i Ni.



**Figura 2.5.** Biplot dels dos components principals resultants de l'aplicació de l'anàlisi per components principals sobre els resultats de la segona etapa del BCR.

Les mostres que es troben a la part central del gràfic són mostres intermèdies, no tenen puntuacions elevades en cap dels dos components, per la qual cosa tindran concentracions en la mitjana del global de mostres.

### 2.3.3.3. Anàlisi per components principals de la tercera etapa del BCR

A la **taula 2.6** podem veure els resultats per a la tercera etapa del BCR; en aquest cas, les concentracions dels metalls estudiats són més baixes que en les altres etapes i les concentracions més elevades corresponen a Pb i Zn. Destaquem les mostres que provenen

de la conca de Beal, B-G7 i RB-6, que presenten les majors concentracions de Pb, mentre que les mostres de residus P-RG1 i B-F3, al seu torn, presenten les concentracions més elevades de Zn i Cd. D'altra banda, la mostra C-E8 (residu provinent de la conca de Carrasquilla) té concentracions elevades tant de Pb com de Zn.

**Taula 2.6.** Resultats de la tercera etapa del BCR en les diferents mostres estudiades.

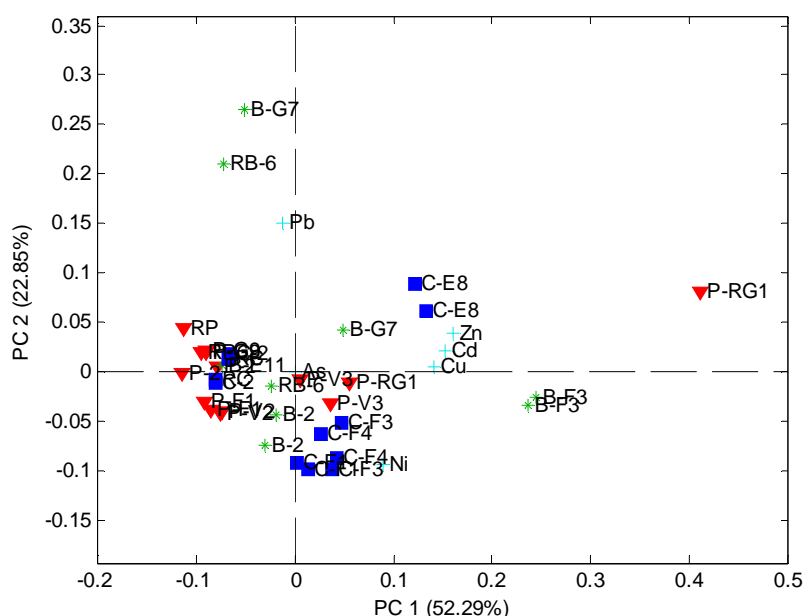
	FRACCIÓ	Pb	Zn	Cd	Cu	Ni	As
P-SM	500	42	30	0,5	0,5	0,5	0,5
P-SM	63	6	511	0,7	6,7	0,5	0,5
B-SM	500	160	1.000	1,7	4,4	2,9	0,5
B-SM	63	12	530	0,7	5,8	3,6	0,5
C-SM	500	170	900	2,2	0,5	0,5	0,5
C-SM	63	23	320	0,5	6,0	1,0	0,5
B-G7	500	900	1.801	6,3	10,0	1,4	0,5
B-G7	63	7.800	980	3,0	4,0	0,9	0,5
P-V3	500	50	1.150	4,0	9,0	1,7	0,5
P-V3	63	17	1.030	3,0	21,0	2,5	0,5
P-RG1	500	480	1.763	5,5	7,6	2,8	0,5
P-RG1	63	540	6.060	19,4	28,0	2,8	0,5
B-F3	500	90	2.600	7,0	54,0	3,7	0,5
B-F3	63	76	2.720	6,7	49,0	4,0	0,5
C-F4	500	300	900	3,5	8,0	4,0	0,5
C-F4	63	150	980	3,4	8,7	4,8	0,5
C-E8	500	2.500	3.240	2,8	30,1	2,1	0,5
C-E8	63	2.340	3.130	2,6	31,4	2,9	0,5
C-F1	500	190	630	2,4	5,3	5,0	0,5
C-F1	63	184	500	2,1	5,6	4,7	0,5
C-F3	500	78	697	3,0	11,0	5,0	0,5
C-F3	63	51	940	4,3	15,7	3,4	0,5
P-V2	500	132	240	0,5	1,1	2,3	0,5
P-V2	63	116	300	0,7	0,5	2,3	0,5
P-F1	500	50	66	0,5	1,0	1,7	0,5
P-F1	63	40	80	0,5	1,5	2,0	0,5
B-E11	500	200	100	0,5	14,0	0,5	0,5
P-G9	500	1.093	140	0,5	5,0	1,1	0,5
P-G9	63	1.020	134	0,5	5,7	1,0	0,5
RB-6	500	500	460	1,1	17,0	2,0	0,5
RB-6	63	7.000	454	1,1	5,8	1,6	0,5
RP	500	1.400	52	0,5	2,0	1,5	0,5
RP	63	1.400	50	0,5	1,6	0,5	0,5
RC	500	40	880	2,1	0,5	0,5	0,5
RC	63	10	290	0,5	7,3	0,9	0,5

Es realitza l'anàlisi per components principals sobre aquesta matriu autoescalada; a la **taula 2.7** s'hi poden veure els resultats obtinguts. En aquest cas, el primer component ens explica un 52,29 % de la variància, mentre que el segon n'explica el 22,85 %, i entre els dos sumen un 75,14 % de la variància de la matriu de dades original.

**Taula 2.7.** Variància explicada pel model de components principals aplicat als resultats de la tercera etapa del BCR.

Component principal	Autovalor	% Variància explicada	% Variància acumulada
1	2,61	52,29	52,29
2	1,14	22,85	75,14

Podem veure el diagrama doble (*biplot*) corresponent als dos components principals a la **figura 2.6**. En aquest cas, la majoria de mostres es troben agrupades en punts centrals entre el tercer i el quart quadrant, a excepció d'uns quants punts que són els que comentarem de manera més àmplia. Els punts corresponents a les mostres B-G7 i RB-6 (només veiem un punt dels dos que corresponen a la mostra perquè la fracció és inferior a  $63 \mu\text{m}$ , la que mostra aquest comportament) presenten elevades puntuacions en el segon component, la qual cosa indica elevades concentracions de Pb. Les mostres P-RG1 (una altra vegada només la corresponent a la fracció fina del residu) i B-F3 presenten elevades puntuacions del primer component, que indica elevades concentracions de Zn, Cd i Cu.



**Figura 2.6.** *Biplot* dels dos components principals resultants de l'aplicació de l'anàlisi per components principals sobre els resultats de la tercera etapa del BCR.

#### 2.3.3.4. Anàlisi per components principals de l'etapa residual del BCR

Els resultats de l'aplicació del BCR, per a l'etapa residual, es mostren a la **taula 2.8**. En aquest cas, igual que en les altres etapes del BCR, Pb i Zn són els metalls que es troben en concentracions més elevades. Cu, Ni i As presenten en aquesta etapa concentracions més elevades que en la resta d'etapes; en el cas de l'As trobem concentracions superiors als  $4.000 \text{ mg kg}^{-1}$ . Destaquem la mostra P-G9 perquè és la que

presenta majors concentracions de Pb, Zn, Cd i As. La mostra B-E11 presenta elevades concentracions de Pb, i la mostra C-E8 presenta elevades concentracions de Zn, Cd i Ni. Per la seva banda, les mostres B-G7 i RB-6 tenen concentracions elevades de Pb, Zn i Cd.

**Taula 2.8.** Resultats de l'etapa residual del BCR en les diferents mostres estudiades.

	FRACCIÓ	Pb	Zn	Cd	Cu	Ni	As
P-SM	500	28	41	0,6	0,5	0,5	33,8
P-SM	63	877	1.100	2,2	18,3	10	290
B-SM	500	1.550	1.770	3,3	40	18,9	540
B-SM	63	3.900	3.500	5,5	66	19	740
C-SM	500	1.000	3.300	5	0,5	0,5	145
C-SM	63	456	1.500	2	11,3	16	480
B-G7	500	9.300	5.230	7	185	9	670
B-G7	63	13.000	4.500	5	190	8,5	700
P-V3	500	4.000	3.500	8	35	15	300
P-V3	63	6.030	3.300	6,1	43,2	15,5	380
P-RG1	500	1.300	2.700	8	18,2	17,8	271
P-RG1	63	2.044	3.800	11	30,4	17,2	330
B-F3	500	2.680	2.020	4,8	46,6	12,9	610
B-F3	63	2.426	2.126	4,9	39,6	12,6	603
C-F4	500	2.400	3.000	7	40	11	400
C-F4	63	3.540	3.250	7,1	50	11,4	580
C-E8	500	1.700	11.100	11,3	152	19,6	90
C-E8	63	1.680	11.126	11,2	164,8	20,3	147
C-F1	500	1.170	4.060	7	25,5	6,2	57,1
C-F1	63	1.210	3.170	5,4	25,1	5,4	71
C-F3	500	1.820	1.640	4,1	52	10,9	170
C-F3	63	2.620	2.000	4,9	62	12,8	210
P-V2	500	1.350	2.050	5	36	20	70
P-V2	63	1.520	1.840	4	32,5	20,8	50
P-F1	500	2.150	780	3,7	40,9	10,3	390
P-F1	63	3.900	1.000	5	60	8	600
B-E11	500	12.500	1.100	3	100	2	500
P-G9	500	37.000	8.500	12,1	510	2	3.700
P-G9	63	39.000	10.580	15,9	796	2,7	4.560
RB-6	500	6.490	3.800	8,3	175	9,4	650
RB-6	63	10.700	3.679	7,1	195	8,4	800
RP	500	700	600	1	0,5	15	30
RP	63	600	600	3	0,5	15	21
RC	500	700	2.100	3,6	0,5	0,5	30
RC	63	600	1.400	1,6	20	12,6	21

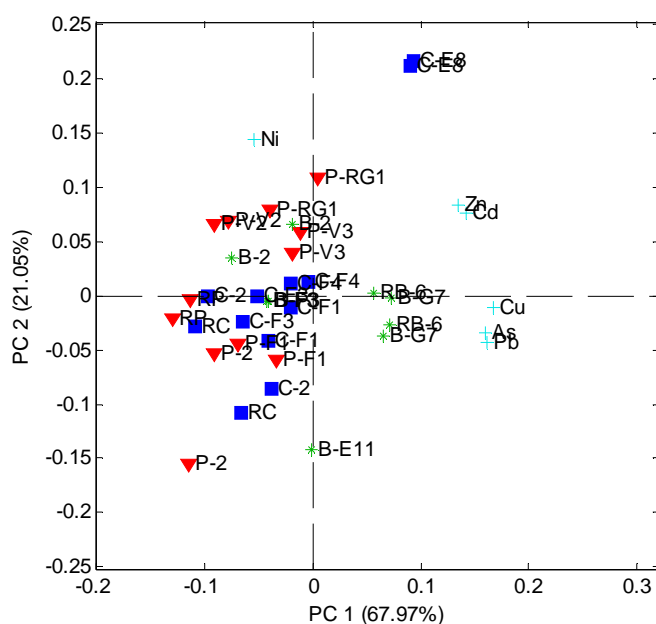
Quan es realitza l'anàlisi per components principals sobre la matriu de dades autoescalada s'obtenen els resultats que es mostren a la **taula 2.9**. Obtenim dos components significatius (autovalor superior a 1) que expliquen un 89,02 % de la variància de les dades.

**Taula 2.9.** Variància explicada pel model de components principals aplicat als resultats de l'etapa residual del BCR.

Component principal	Autovalor	% Variància explicada	% Variància acumulada
1	4,08	67,97	67,97
2	1,26	21,05	89,02



Podem veure el gràfic *biplot* dels dos components a la **figura 2.7**. En aquest cas hem realitzat un zoom de la part central per tal de poder veure millor la distribució de les mostres, ja que el punt corresponent a la mostra P-G9 es trobava en l'extrem dret del gràfic i feia que es veiés la resta de punts molt agrupats. El considerem un valor extrem, tal com ja vèiem en avaluar els resultats obtinguts (presenta concentracions molt elevades de la majoria de metalls). El primer component té puntuacions positives per a tots els metalls excepte el Ni, mentre que el segon component té puntuacions positives per a Zn, Cd i Ni i negatives per a Cu, As i Pb.



**Figura 2.7.** *Biplot* dels dos components principals resultants de l'aplicació de l'anàlisi per components principals sobre els resultats de l'etapa residual del BCR (zoom de la part central).

### 2.3.3.5. Anàlisi per components principals en dues dimensions de la matriu desdoblada

Per avaluar els resultats del BCR complet hem d'arranjar les quatre matrius que hem avaluat per separat en una sola matriu. Per fer-ho, la primera opció escollida és arranjar les quatre matrius en una matriu augmentada en vertical, és a dir, col·locant una matriu damunt de l'altra [2.21]. D'aquesta manera obtenim una matriu de dimensions  $60 \times 6$  (15 mostres  $\times$  4 etapes i 6 variables o metalls) que autoescalem de manera conjunta per mantenir les diferències que hi pugui haver entre etapes [2.22]. En aquesta part de l'anàlisi utilitzem només les fraccions corresponents a una mida de partícula inferior a 63

$\mu\text{m}$ , ja que de l'anàlisi de les matrius de les quatre etapes per separat hem vist que en la majoria de casos les dues fraccions de les mostres tenien un comportament similar.

Els resultats de l'aplicació del procediment d'extracció seqüencial es mostren a la **taula 2.10**, on es pot veure que les mostres es troben contaminades per metalls, principalment Pb i Zn, que eren els metalls extrets per la mineria de la zona. La localització geogràfica d'aquestes mostres es pot veure a la **figura 2.2**. Els paràmetres estadístics dels metalls estudiats es troben a la **taula 2.11**. Les concentracions de Pb i Zn són sempre superiors a les de la resta de metalls estudiats. La distribució de les concentracions de metalls entre les mostres per a cada etapa del BCR es troba esbiaixada cap als valors baixos, com es pot veure per la diferència entre els valors de la mitjana i la mediana, principalment per a Pb, Zn i Cd. El Pb es troba, de manera general, en concentracions majors que el Zn en totes les etapes d'extracció, amb major variabilitat entre mostres. Pel que fa al As, la seva concentració "pseudototal" és relativament elevada, però en fer-ne el fraccionament es veu que es troba únicament en l'etapa residual, cosa que indica que no es troba en una forma potencialment mòbil o disponible.

**Taula 2.10.** Resultats de l'aplicació del procediment d'extracció seqüencial sobre les mostres estudiades. Les concentracions s'expressen en  $\text{mg kg}^{-1}$ .

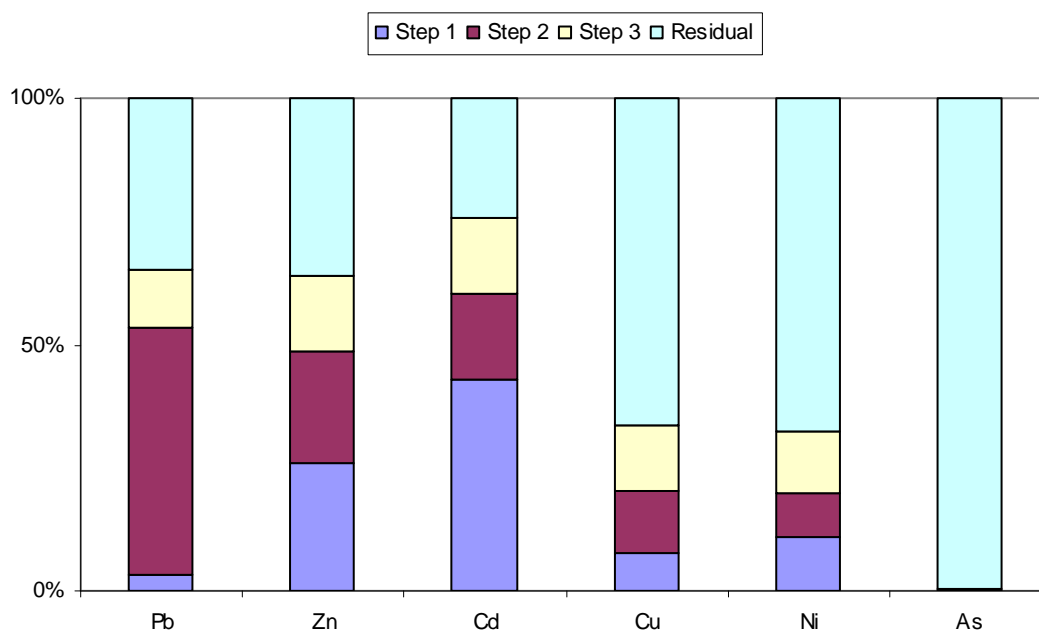
	Pb	Zn	Cd	Cu	Ni	As
<b>Etapa 1</b>						
P-SM	571	650	3	7	0,5	0,5
P-SR	1.200	15	0,5	1,1	0,5	0,5
P-V3	150	3.600	13	5	3	0,5
P-V2	194	2.970	12	0,6	2	0,5
P-RG1	390	276	1,2	4	2	0,5
P-F1	6	134	0,5	0,5	2	0,5
B-SM	660	1.320	3	3	1,1	0,5
B-SR	157	809	3	9	3	0,5
B-G7	115	5.500	24	7	6	0,5
B-F3	213	2.340	10	47	4	0,5
C-SM	100	260	3	0,9	0,5	0,5
C-SR	193	457	5	2	0,5	0,5
C-F4	161	2.950	12	4	3	0,5
C-F1	198	2.890	25	1,1	3	0,5
C-F3	520	2.490	16	5	1,1	0,5
<b>Etapa 2</b>						
P-SM	560	710	0,5	3	0,5	0,5
P-SR	269	300	0,8	5	2	0,5
P-V3	2.500	2.290	3	8	2	0,5
P-V2	1.390	2.330	4	6	2	0,5
P-RG1	2.070	164	0,9	3	0,5	0,5
P-F1	424	98	0,5	2	0,5	0,5
B-SM	3.580	2.230	0,8	18	4	0,5
B-SR	21.500	500	2	18	0,5	0,5
B-G7	22.100	1.600	4	23	2	0,5
B-F3	4.200	1.800	3	12	0,8	0,5
C-SM	1.200	1.200	4	7	2	0,5
C-SR	1.560	1.440	3	6	2	0,5
C-F4	7.727	1.810	7	11	2	0,5
C-F1	6.340	3.360	12	23	2	0,5
C-F3	1.650	3.310	7	17	2	0,5
<b>Etapa 3</b>						
P-SM	6	511	0,7	7	0,5	0,5
P-SR	1.400	50	0,5	2	0,5	0,5
P-V3	17	1.030	3	21	3	0,5
P-V2	116	300	0,7	0,5	2	0,5
P-RG1	540	6.060	19	28	3	0,5
P-F1	40	80	0,5	2	2	0,5
B-SM	12	530	0,7	6	4	0,5
B-SR	7.000	454	1,1	6	2	0,5
B-G7	7.800	980	3	4	0,9	0,5
B-F3	76	2.720	7	49	4	0,5
C-SM	23	320	0,5	6	1	0,5
C-SR	10	290	0,5	7	0,9	0,5
C-F4	150	980	3	9	5	0,5
C-F1	184	500	2	6	5	0,5
C-F3	51	940	4	16	3	0,5
<b>Residual</b>						
P-SM	877	1.100	2	18	10	290
P-SR	600	600	3	0,5	15	21
P-V3	6.030	3.300	6	43	16	380
P-V2	1.520	1.840	4	33	21	50
P-RG1	2.044	3.800	11	30	17	330
P-F1	3.900	1.000	5	60	8	600
B-SM	3.900	3.500	6	66	19	740
B-SR	10.700	3.679	7	195	8	800
B-G7	13.000	4.500	5	190	9	700
B-F3	2.426	2.126	5	40	13	603
C-SM	456	1.500	2	11	16	480
C-SR	600	1.400	2	20	13	21
C-F4	3.540	3.250	7	50	11	580
C-F1	1.210	3.170	5	25	5	71
C-F3	2.620	2.000	5	62	13	210

**Taula 2.11.** Resum dels paràmetres estadístics per a cada metall en cada etapa del BCR. Les concentracions s'expressen en mg kg<sup>-1</sup>.

		Mínim	Màxim	Mitjana	Mediana	SD
Etapa 1	Pb	6	1.200	322	194	308
	Zn	15	5.500	1.777	1.320	1.616
	Cd	0,5	25	9	5	8
	Cu	0,5	47	6	4	12
	Ni	0,5	6	2	2	2
	As	-	-	-	-	-
Etapa 2	Pb	269	22.100	5.138	2.070	7.095
	Zn	98	3.360	1.543	1.600	1.058
	Cd	0,5	12	4	3	3
	Cu	2	23	11	8	7
	Ni	0,5	4	2	2	1
	As	-	-	-	-	-
Etapa 3	Pb	6	7.800	1.162	76	2.563
	Zn	50	6.060	1.050	511	1.529
	Cd	0,5	19	3	1,1	5
	Cu	0,5	49	11	6	13
	Ni	0,5	5	2	2	2
	As	-	-	-	-	-
Residual	Pb	456	13.000	3.562	2.426	3.731
	Zn	600	4.500	2.451	2.126	1.212
	Cd	2	11	5	5	2
	Cu	0,5	195	56	40	58
	Ni	5	21	13	13	4
	As	21	800	392	380	275
Total	Pb	1.779	43.015	10.183	5.044	12.912
	Zn	965	12.580	6.821	7.580	3.633
	Cd	4,8	44	20	20,7	13
	Cu	8,6	228	85	65	67
	Ni	11,5	28,1	19	19,1	5
	As	21	800	392	380	275

Els resultats són difícils d'interpretar de forma numèrica, és molt més fàcil veure'ls en forma gràfica: a la **figura 2.8** es mostren les mitjanes del fraccionament per a cada metall. Tot i que en forma gràfica podem començar a dibuixar alguna conclusió, aquestes són limitades i es refereixen únicament al comportament global dels metalls. D'aquesta manera, podem dir que Cu, Ni i As s'extreuen majoritàriament en l'etapa residual, mentre que el Pb presenta els majors percentatges d'extracció, comparat amb els altres metalls, en la segona etapa del BCR, tot i que una part significativa s'extreu en l'etapa residual. Zn i Cd s'extreuen de manera significativa en la primera etapa, la qual cosa indica que aquests metalls es troben presents de forma més mòbil; a causa del processament que se'ls ha

donat s'han transformat en contaminants antropogènics (no es troben en l'estructura mineral). La concentració de metall extreta en la tercera etapa del BCR és molt baixa per a tots els metalls. Amb aquestes dades, però, no podem dir res sobre el comportament de les mostres individuals o si existeix alguna relació entre elles. En aquest punt l'anàlisi per components principals es dibuixa com l'eina més útil per interpretar totes les dades de què disposem de manera conjunta i simplificada.



**Figura 2.8.** Resultats obtinguts de l'aplicació del procediment d'extracció seqüencial proposat pel BCR per a cada metall (es representa la mitjana de totes les mostres estudiades).

Amb l'anàlisi de les correlacions entre metalls podem veure la presència de relacions entre aquests. La matriu de correlacions es mostra a la **taula 2.12**, on podem veure que el Zn es troba correlacionat amb el Cd, mentre que el Cu i el Ni estan correlacionats amb el As, però no entre ells. Hem comprovat que aquests coeficients de correlació siguin significants ( $p < 0,01$ ).

**Taula 2.12.** Matriu de correlacions (valors subratllats  $\geq |0,70|$ ).

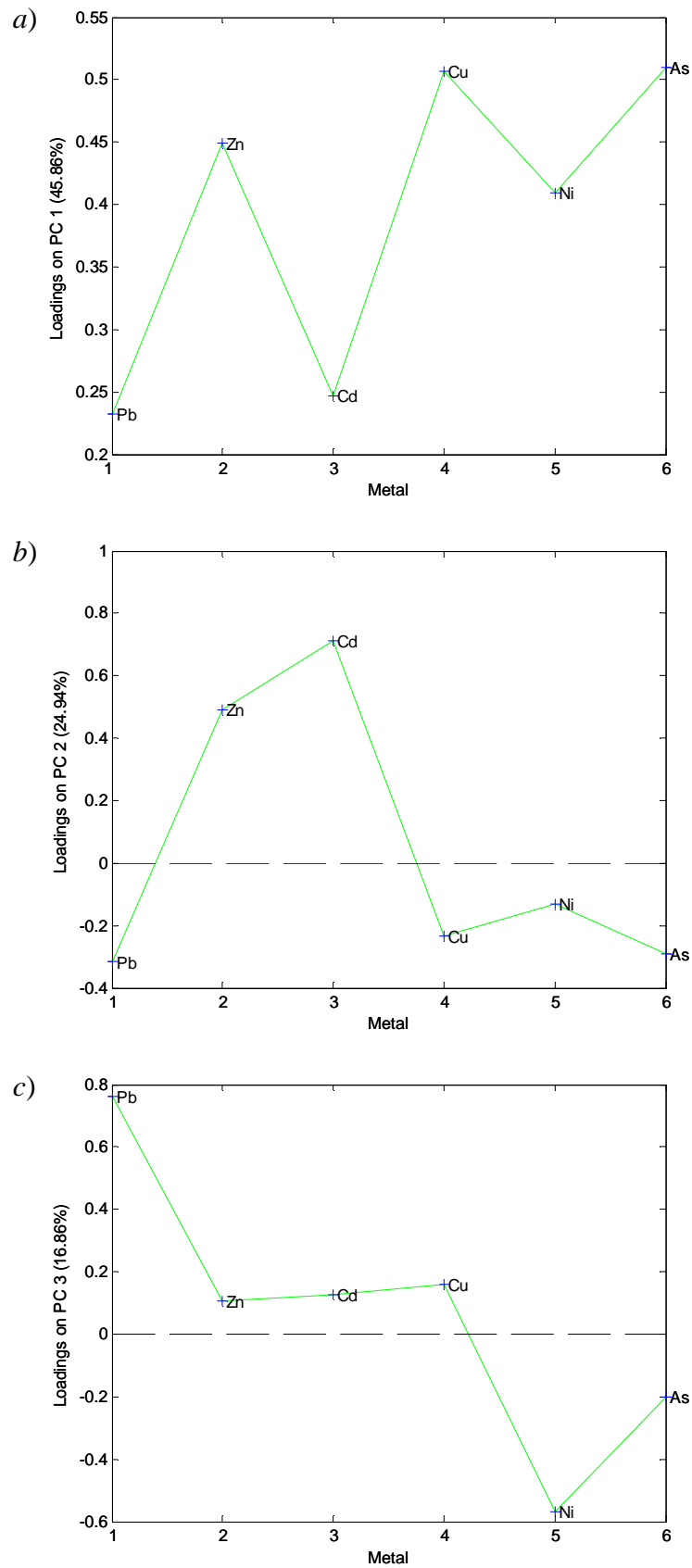
	Pb					
Pb	1	Zn				
Zn	0,13	1	Cd			
Cd	-0,06	<u>0,77</u>	1	Cu		
Cu	0,43	0,47	0,09	1	Ni	
Ni	0,02	0,35	0,08	0,40	1	As
As	0,27	0,37	0,04	<u>0,77</u>	0,65	1

L’anàlisi per components principals en dues dimensions s’ha dut a terme amb les dades normalitzades i s’han retingut els autovalors majors que 1. D’aquesta manera obtenim un model amb tres components principals (**taula 2.13**), amb els quals podem explicar un 87,65 % de la variància total de les dades.

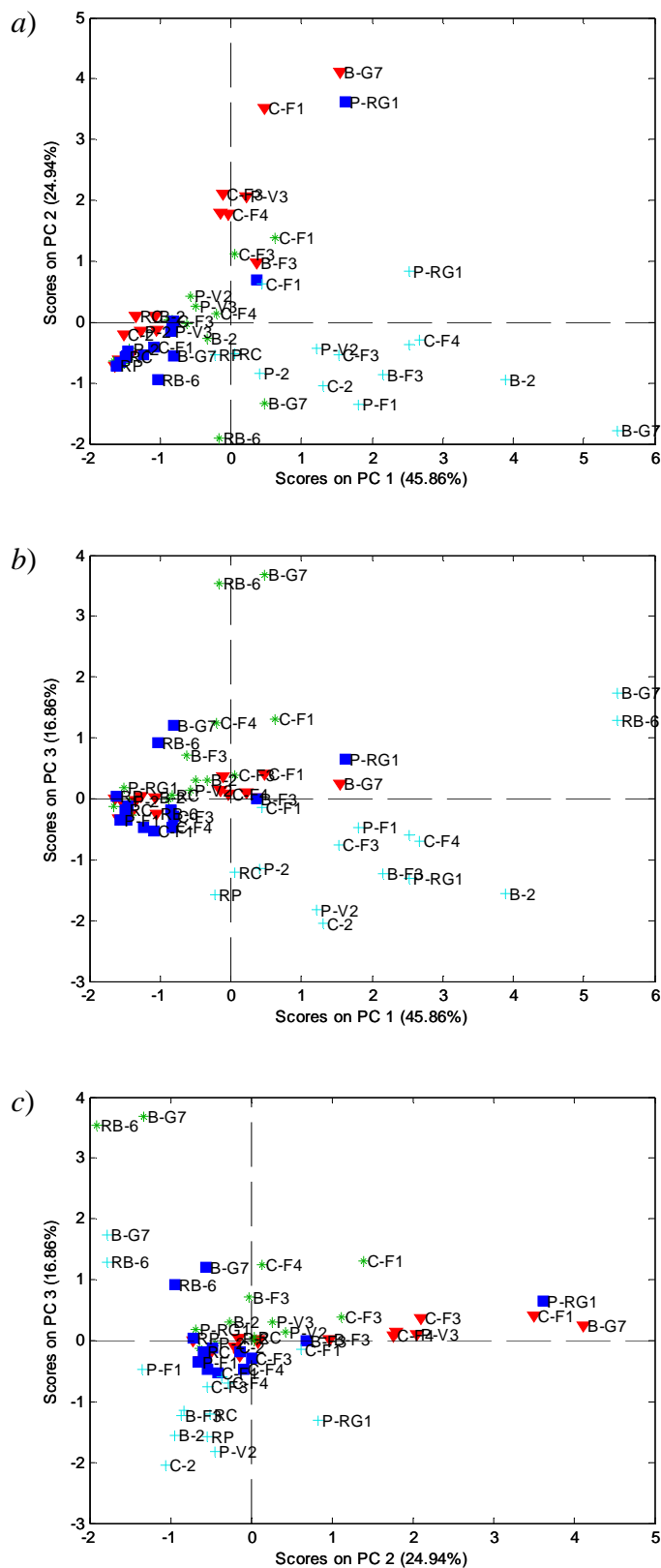
**Taula 2.13.** Variància explicada pel model de components principals aplicat a les dades.

Component principal	Autovalor	% Variància explicada	% Variància acumulada
1	2,75	45,86	45,86
2	1,50	24,94	70,79
3	1,01	16,86	87,65
4	0,44	7,36	95,01
5	0,18	3,06	98,07
6	0,12	1,93	100,00

A la **figura 2.9** veiem la representació gràfica de les càrregues per als tres components utilitzats. El primer component principal (explica el 45,86 % de la variància de les dades) té càrregues positives i elevades per a Zn, Cu, Ni i As en contrast amb Pb i Cd, amb càrregues positives però baixes, per la qual cosa descriu un comportament de contaminació general. El segon component (24,94 % de la variància) té càrregues positives i elevades per a Zn i Cd, mentre que les càrregues per a Pb, Cu, Ni i As són negatives. Així, el segon component està descrivint el contrast entre el comportament de Zn i Cd i el de la resta de metalls. Com hem comentat en el fraccionament dels metalls, aquests dos són els metalls més mòbils en aquestes mostres. El tercer component (16,86 %) té càrregues positives i elevades per a Pb i negatives per a Ni i As, mentre que les càrregues per a Zn, Cd i Cu són positives però moderades. Aquest darrer component descriu la mobilització de part del Pb i l’escassa mobilitat de Ni i As, per contraposició.



**Figura 2.9.** Representació gràfica de les càrregues per a cada component en l'anàlisi per components principals de les dades.



**Figura 2.10.** Representació gràfica de les puntuacions de les mostres per a cada component. S'utilitzen diferents símbols d'acord amb les diferents etapes del BCR (primera etapa, triangles vermells; segona, estrelles verdes; tercera, quadres blaus, i residual, creus blaves).



Els gràfics de les puntuacions de cada mostra per a cada component principal es mostren a la **figura 2.10**. El primer component descriu una contaminació general amb contribució de totes les variables (i ens separa les mostres corresponents a l'etapa residual, que presenten concentracions més elevades). Les mostres que es troben a la part dreta del gràfic presentaran concentracions més elevades de Zn, Cu, Ni i As que les mostres que es troben més a l'esquerra. En aquest sentit, diferenciem tres mostres que corresponen a l'etapa residual del BCR: RB-6, B-G7 i B-2 (mostres provinents de la conca de Beal i que corresponen a sediment de la rambla, residu miner i sediment marí, respectivament), totes amb elevades concentracions de As.

Puntuacions positives en el segon component ens indiquen elevades concentracions de Zn i Cd; aquests dos metalls s'extreuen principalment en la primera etapa del BCR, la qual cosa indica que són mòbils. En aquest cas podem veure diferenciades les mostres B-G7 i C-F1, que presenten elevades concentracions de Cd, i C-F3, C-F4 i P-V3, que presenten elevades concentracions de Zn en la primera etapa del BCR, mentre que P-RG1 presenta elevades concentracions de Zn i Cd en la tercera etapa del BCR. Com podem veure, totes les mostres diferenciades per aquest segon component corresponen a mostres de residus miners provinents de les tres conques hidrogràfiques estudiades.

El tercer component està fortament carregat per Pb i ens permet diferenciar dues mostres, RB-6 i B-G7, que tenen elevades puntuacions per a les mostres corresponents a la segona etapa i a la residual, mentre que per a la primera etapa tenen un valor central. Aquests dos punts, que corresponen a mostres de sediment de la rambla i a residu miner provinents de la conca de Beal, presenten elevades concentracions de Pb en totes les etapes del BCR, excepte en la primera.

L'anàlisi dels resultats mitjançant l'anàlisi per components principals en dues dimensions ens dóna informació sobre el comportament general de fraccionament dels metalls en les quatre etapes del BCR i, a més, ens permet extreure informació general de les mostres estudiades. La interpretació dels resultats encara és una mica confusa i no es dedueix de manera immediata. Per intentar aprofundir en aquestes qüestions, es planteja l'ús d'altres tècniques multivariants, multidimensionals, que permetin extreure més informació de les dades.

### 2.3.3.6. Anàlisi per components principals en tres dimensions: PARAFAC

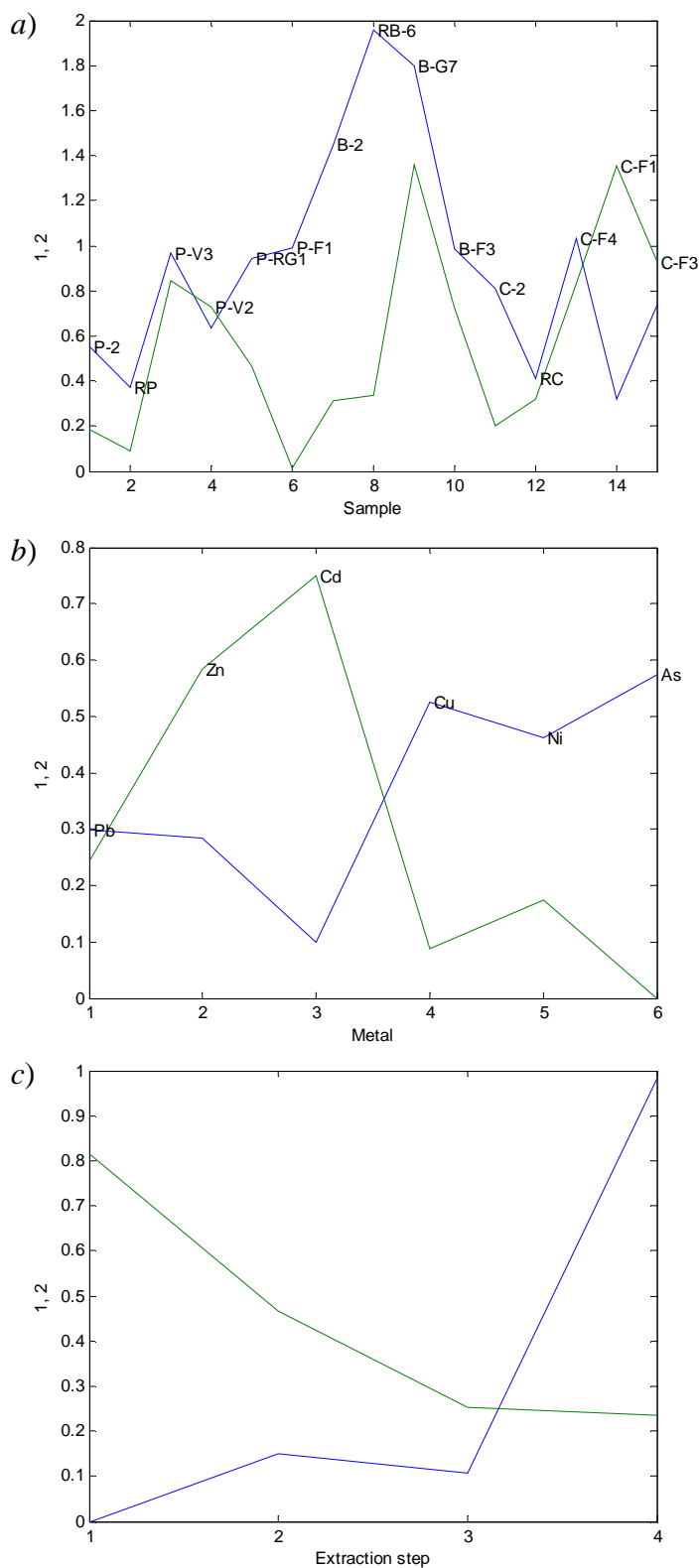
L'estructura de les dades ens fa pensar en l'aplicació d'altres models multivariants que permetin una estructura tridimensional de les dades i ens donin l'oportunitat d'aprofundir en l'estudi de les nostres mostres. En el nostre cas estructurarem les dades en forma de cub tridimensional on tenim, per un costat, variables, mostres i etapes del BCR [2.21, 2.22]. Els models més utilitzats per a l'anàlisi per components principals en tres dimensions són PARAFAC i Tucker3. La interpretació visual dels tres modes conjuntament es pot realitzar per als dos models, però, com hem comentat a la introducció, PARAFAC és el model més simple i per aquesta raó és el que aplicarem a les dades.

Hem autoescalat cada matriu individual per separat abans de fer l'arranjament en cub. La matriu tridimensional s'escala de manera tridimensional i s'utilitza la restricció de "no-negativitat". El fet de restringir el model fa que perdem explicació de la variància de les dades, però el fa més real en el nostre cas, ja que les concentracions no poden ser negatives.

El nombre de factors, F, s'escull mitjançant el criteri de *core consistency*, que considerem òptim per a un model de dos factors que explica un 73,25 % de la variància de les dades amb un 99 % de *core consistency*. Es perd variància explicada, però els resultats obtinguts seran més senzills que en el cas del PCA. La **figura 2.11** mostra la representació de les càrregues per als modes A (**figura 2.11a**), B (**figura 2.11b**) i C (**figura 2.11c**), és a dir, per a les mostres, metalls i etapes del BCR, respectivament.

A partir de l'observació de les càrregues en els modes B i C podem extreure informacions similars a les trobades en aplicar l'anàlisi per components principals en dues dimensions. El primer component del tercer mode (**figura 2.11c**) descriu bàsicament l'etapa residual, amb una menor contribució de la segona i tercera etapes. En canvi, el segon component es troba especialment carregat per la primera etapa, menys per la segona i, finalment, té alguna contribució de la tercera etapa i la residual. D'acord amb aquests resultats i avaluant les càrregues en el segon mode (**figura 2.11b**), el primer component descriu bàsicament la dificultat d'extracció de Cu, Ni i As, mentre que el segon component es refereix a metalls més mòbils, com són Zn i Cd, que s'extreuen majoritàriament en les primeres etapes del BCR. El Pb té una contribució moderada en els dos components,

perquè s'extreu majoritàriament en la segona etapa del BCR, la qual cosa ens dona un metall més mòbil, però també en queda una part significativa en l'etapa residual.



**Figura 2.11.** Representació gràfica de les càrregues del model PARAFAC aplicat a les dades: *a)* mostres, *b)* metalls i *c)* etapes del BCR. El primer factor és el representat en blau, i el segon en verd.

Amb el model PARAFAC aconseguim extreure informació més fàcilment sobre el comportament individual de les diferents mostres estudiades i sobre la seva localització geogràfica a través d'un estudi en profunditat del primer mode (**figura 2.11a**). En aquest gràfic es troben representades les mostres provinents de les tres conques hidrogràfiques estudiades (Ponce, Beal i Carrasquilla, en aquest ordre), i s'hi observen algunes tendències en el comportament de les diferents mostres. En primer lloc, veiem que les mostres RB-6, B-G7 i B-2 presenten les càrregues més elevades en el primer component. Podem relacionar aquestes mostres amb elevades concentracions de Pb i As en l'etapa residual, i provenen de la conca de Beal. Les mostres P-V3, P-V2, B-G7, B-F3, C-F4, i C-F3 presenten les càrregues més elevades en el segon component, mentre que les mostres P-2, RP, P-F1, B-2, C-2 i RC tenen les càrregues més baixes d'aquest component. Les primeres estan relacionades amb elevades concentracions de Zn i Cd en les fraccions més fàcilment extraïbles, i totes corresponen a residus provinents de les tres conques estudiades. D'altra banda, les darreres mostres corresponen a mostres de sediment de les rambles i sediment marí provinents de les tres conques, que tenen menors concentracions de Zn i Cd que els residus.

En general, el primer factor ens permet diferenciar les mostres que provenien de la conca hidrogràfica de Beal. Observant els altres gràfics adjunts podem associar les mostres de Beal amb elevades concentracions de Cu, Ni i As en l'etapa residual del BCR comparant-les amb la resta de mostres estudiades. D'altra banda, el segon factor ens permet diferenciar entre les mostres que corresponen a residus, per una banda, i les mostres que corresponen a sediments del llit de les rambles i a sediments del mar Menor de la desembocadura de les rambles, per l'altra, perquè les mostres corresponents a residus es poden associar a continguts majors de Zn i Cd.

## 2.4. CONCLUSIONS

Les principals conclusions que extraiem d'aquest estudi són:

1. La comparació dels resultats de l'aplicació del test de lixiviació DIN 38414-S4 i del procediment d'extracció seqüencial BCR a mostres de diferents tipus de residus de mineria posa de manifest que l'extracció de metalls en el test de lixiviació està governada pel pH de les mostres, mentre que no és així en l'aplicació de l'esquema de fraccionament BCR, la primera etapa del qual consisteix en una extracció amb una dissolució àcida. A partir dels resultats obtinguts es pot concloure que la mobilitat potencial dels metalls està determinada pel tractament que ha originat el residu juntament amb la seva composició.
2. L'anàlisi per components principals sobre les matrius individuals dels resultats de cada etapa del BCR per a mostres de residus i sediments, ens permet aprofundir en el comportament de les mostres en cada etapa i evidenciar comportaments extrems de determinades mostres.
3. En general, l'anàlisi per components principals ens permet obtenir agrupacions entre els metalls i obtenir certs valors extrems, però no trobem una agrupació clara de les mostres ni relacions entre elles.
4. L'aplicació del model multivariant PARAFAC sobre les mostres analitzades ens permet aprofundir en l'estructura de les dades i observar-hi les relacions presents. Amb aquest model podem avaluar tota la informació present de manera més senzilla. En general, podem diferenciar, d'una banda, les mostres provinents de la conca de Beal, ja que aquestes són les que tenen una contaminació per metalls més elevada. De l'altra, podem diferenciar entre les mostres corresponents a residus (amb una concentració de metalls més elevada) i les corresponents a sediments.

---

## 2.5. REFERÈNCIES

- [2.1] SAHUQUILLO A, RIGOL A, RAURET G (2003) Overview of the use of leaching/extraction tests for the risk assessment of trace metals in contaminated soils and sediments. *Trac-Trends Anal Chem* 22:152-159
- [2.2] GÄBLER HE (1997) Mobility of heavy metals as a function of pH of samples from an overbank sediment profile contaminated by mining activities. *J Geochem Explor* 58:185-194
- [2.3] SVETE P, MILACIC R, PIHLAR B (2001) Partitioning of Zn, Pb and Cd in river sediments from a lead and zinc mining area using the BCR three-step sequential extraction. *J Environ Monit* 3:586-590
- [2.4] RAURET G (1998) Extraction procedures for the determination of heavy metals in contaminated soil and sediment. *Talanta* 46:449-455
- [2.5] VAN DER SLOOT HA, COMANS RNJ, HJELMAR O (1996) Similarities in the leaching behaviour of trace contaminants from waste, stabilized waste, construction materials and soils. *Sci Total Environ* 178:111-126
- [2.6] SCARPONI G *et al.* (1998) Chemometric studies in the lagoon of Venice, Italy. 1. The Environmental quality of water and sediment matrices. *J Chem Inf Comput Sci* 38:552-562
- [2.7] PARDO R *et al.* (2004) Application of two- and three-way principal component analysis to the interpretation of chemical fractionation results obtained by the use of the B.C.R. Procedure. *Anal Chim Acta* 523:125-132
- [2.8] SINGH KP *et al.* (2007) Multi-way data modeling of heavy metal fractionation in sediments from Gomti River (India). *Chemometrics Intell Lab Syst* 87:185-193
- [2.9] OTTO M (1999) *Chemometrics* (1a ed.) Weinheim: Wiley-VCH
- [2.10] BRERETON RG (2003) *Chemometrics: data analysis for the laboratory and chemical plant* (1a ed.) West Sussex: John Wiley & Sons
- [2.11] BLANCO M, CERDÀ V (Eds.) (1998) *Quimiometria* (1a ed.) Barcelona: Publicacions de la Universitat Autònoma de Barcelona
- [2.12] BARTOLOMEO A DE *et al.* (2004) Relationship among parameters of lake polluted sediments evaluated by multivariate statistical analysis. *Chemosphere* 55:1323-1329

- [2.13] SINGH KP *et al.* (2006) Multi-way data analysis of soils irrigated with wastewater—A case study. *Chemometrics Intell Lab Syst* 83:1-12
- [2.14] ACETO M *et al.* (2003) The use of mosses as environmental metal pollution indicators. *Chemosphere* 50:333-342
- [2.15] WOLD S, ESBENSEN K, GELADI P (1987) Principal Component Analysis. *Chemometrics Intell Lab Syst* 2:37-52
- [2.16] BRO R (1997) PARAFAC. Tutorial and applications. *Chemometrics Intell Lab Syst* 38:149-171
- [2.17] DIN 38414-S4: German standards methods for the examination of water, waste water and sludge; group S (sludge and sediments); determination of leachability by water (S4). Institut für Normung, Berlin, 1984
- [2.18] PERÉ-TREPAT E *et al.* (2006) Chemometrics modelling of organic contaminants in fish and sediment river samples. *Sci Total Environ* 371:223-237
- [2.19] <http://www.arc-cat.net/ca/municipals/installacions/diposit/criteris.html> (11/07/07)
- [2.20] RAMIS RAMOS G, GARCÍA ALVAREZ-COQUE MC (2001) *Quimiometría* (1a ed.) Madrid: Editorial Síntesis
- [2.21] TAULER R, BARCELÓ D, THURMAN EM (2000) Multivariate correlation between concentrations of selected herbicides and derivatives in outflows from selected U.S. midwestern reservoirs. *Environ Sci Technol* 34:3307-3314
- [2.22] FELIPE-SOTELO M *et al.* (2007) Temporal characterisation of river waters in urban and semi-urban areas using physico-chemical parameters and chemometric methods. *Anal Chim Acta* 583:128-137



## **CAPÍTOL 3**

**Avaluació de la biodisponibilitat  
dels metalls presents en els  
sediments del mar Menor**





### 3.1. INTRODUCCIÓ

Com ja s'ha vist en capítols anteriors, les activitats mineres sovint són la causa de la presència de metalls en aigua i sediment a concentracions elevades, que poden tenir un greu impacte en la biota. Els organismes vius poden acumular els metalls (Cu, Zn, Cd, Cr, Fe, etc.), que, al seu torn, són assimilats i transferits al llarg de la xarxa tròfica mitjançant la magnificació, resultant en riscos pels animals i els humans. La biodisponibilitat, generalment definida com el grau en què una substància pot ser assimilada en el sistema d'un organisme, és un concepte especialment important en l'avaluació dels riscos de l'exposició dels organismes a contaminants en sòls i sediments. La biodisponibilitat d'aquests compostos que es troben en el sediment depèn de les característiques físiques, químiques i biològiques de l'aigua intersticial i el sediment. La partició del metall entre les diferents fraccions del sediment és molt important per predir la biodisponibilitat [3.1, 3.2] tal com hem vist en el **capítol 1**. Essencialment es poden considerar dos processos:

- Un procés de desorció fisicoquímica, pel qual els metalls s'equilibren entre la fase sòlida i l'aigua de porus.
- Un procés d'assimilació fisiològica des de la fase sòlida o líquida fins a l'organisme.

Les característiques del sediment tenen un paper important en els processos fisicoquímics, que determinen la possible toxicitat a la biota associada a la contaminació del sediment. Una substància unida a un sediment pot ser alliberada a l'aigua i llavors passar a través d'una membrana biològica a un organisme, o pot ser transferida directament a través d'una membrana des del sediment fins a un organisme. Un cop dins l'organisme, una substància potencialment tòxica pot emigrar a un receptor bioquímic a l'organisme, on exerceix un efecte tòxic. S'assumeix que els efectes tòxics només es manifesten després de traspasar un valor crític intern en els òrgans d'un organisme [3.2, 3.3]. L'ús d'espècies biològiques en la monitorització de la qualitat del medi aquàtic permet avaluar els nivells de contaminants disponibles biològicament en l'ecosistema o els efectes dels contaminants en els organismes que hi viuen [3.4]. La monitorització ens permetrà avaluar la fracció amb rellevància ecotoxicològica directa en lloc de la càrrega de contaminants presents, que és el tema del **capítol 1**.

L'ús d'organismes marins com a bioindicadors per a la pol·lució de metalls traça és molt comú. Algues i mol·luscs es troben entre els organismes més utilitzats per a aquest propòsit. Aquests poden acumular metalls traça i presentar concentracions milers de vegades més elevades que les corresponents a l'aigua. Per escollir el biomonitor adient, necessitem considerar les fonts potencials de metall. Les algues que no es troben en contacte amb el sediment únicament assimilaran el metall dissolt, mentre que els mol·luscs, que viuen en el sediment i filtren grans quantitats d'aigua, assimilaran metalls tant de l'aigua com de les partícules en suspensió. Per altra banda, un biomonitor ha de satisfer certs requeriments bàsics: ser sedentari, que les seves dimensions siguin portables, ser fàcil d'identificar i recollir, estar àmpliament distribuït i acumular metalls en un grau acceptable. En aquest sentit, les algues verdes satisfan aquests requeriments i trobem les espècies *Ulva*, *Fucus* i *Sargassum* que tenen un potencial particular com a espècies biomonitores. Concretament, les algues més utilitzades en estudis de biomonitorització al mar Mediterrani són del gènere *Ulva* [3.5, 3.6].

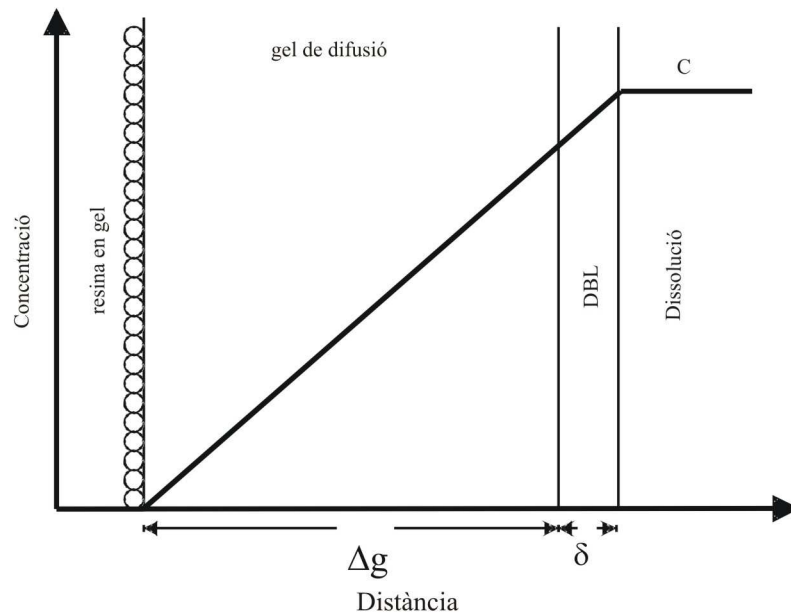
Més recentment s'estan començant a utilitzar estudis sobre el contingut de metall en biofilm amb la finalitat d'avaluar la contaminació aquàtica i la biodisponibilitat dels metalls. Aquesta aproximació es basa en el fet que la biodisponibilitat dels metalls afecta la concentració de metall sorbida i acumulada en els organismes. Diversos estudis han demostrat que la biodisponibilitat dels metalls per a les algues està determinada per l'activitat dels ions lliures [3.7]. El perífiton, un biofilm natural compost d'algues, ha estat relativament ben estudiat en experiments de camp. La seva sensibilitat als canvis al seu voltant i la seva capacitat d'acumular metalls estan ben documentades. S'han fet estudis per investigar els efectes dels metalls en la comunitat d'algues i particularment per avaluar l'estat de sistemes aquàtics respecte a la contaminació metàl·lica deguda a activitats industrials. L'acumulació de metalls s'utilitza sovint com una mesura de la biodisponibilitat dels metalls, ja que en la majoria de casos els metalls han de ser assimilats per mostrar efectes [3.8, 3.9].

Les comunitats de perífiton (biofilm) se situen en sistemes aquàtics i acumulen metalls per tres mecanismes principalment: absorció en substàncies polimèriques extracel·lulars, sorció a la superfície cel·lular i assimilació intracel·lular. La seva habilitat per assimilar materials, la seva naturalesa sèssil i la facilitat amb la qual pot ser mostrejat en fan un bon indicador o biomonitor. L'acumulació de metalls pel perífiton pot tenir

implicacions importants per als organismes que es troben en un nivell superior a la xarxa tròfica.

L'especiació metàl·lica en solució és essencial per estudiar el metall assimilat pels organismes i els processos geoquímics [3.10]. La majoria de tècniques capaces de realitzar l'especiació tenen un potencial limitat per realitzar mesuraments *in situ*. Recentment s'ha desenvolupat una nova tècnica per avaluar la biodisponibilitat dels metalls en aigües, sòls i sediments: *diffusive gradients in thin films* (DGT). Aquesta tècnica, que es pot aplicar *in situ*, es basa en un simple i robust mecanisme que acumula metalls, en proporció a la seva concentració en solució, després del seu transport a través d'una capa de difusió ben definida. Normalment s'utilitza un hidrogel de poliacrilamida, de gruix conegut, com a capa de difusió, mentre que, per a metalls traça, s'utilitza com a agent enllaçant una resina Chelex-100 (amb un grup funcional iminodiacetat) incorporada en una segona capa de gel. Els dos gels s'adjunten en un petit dispositiu de plàstic, que és submergit en la dissolució, i el transport dels ions metàl·lics es produeix únicament per difusió molecular. Mitjançant l'adequada selecció del gruix de la capa de gel (~ 1 mm), la massa d'ions metàl·lics acumulada serà independent de la hidrodinàmica de la solució per sobre d'un nivell lliure de convecció. D'aquesta manera, quan els dispositius DGT se situen en règims convectius no controlats, com rius, efluent, llac o mar, les mesures són completament quantitatives i independents de les variacions de flux [3.11, 3.12]. La tècnica DGT realitza una preconcentració *in situ* dels anàlits, de manera que s'eviten els problemes habituals de contaminació. A més, en fer el mesurament sobre l'eluat de la resina, es redueixen considerablement les dificultats relacionades amb la matriu de la mostra [3.13, 3.14]. La tècnica DGT s'ha utilitzat per mesurar concentracions de metalls en aigües [3.10, 3.11, 3.15, 3.16], també s'ha utilitzat en sòls i sediments per determinar la concentració de metalls en l'aigua de porus i els fluxos des de la fase sòlida [3.17- 3.21]. A diferència dels mètodes més clàssics (separació de l'aigua de porus o extracció amb  $\text{CaCl}_2$ ), la situació natural gairebé no s'altera, és a dir, no es modifiquen els equilibris de partició dels metalls entre la fase sòlida i l'aigua de porus [3.3]. S'ha postulat la tècnica DGT com una alternativa possible als mètodes per avaluar la contaminació metàl·lica, amb l'avantatge que els factors biòtics (l'edat, la mida, el sexe, l'estat reproductiu, etc.) no afecten l'assimilació de metall i els efectes dels factors abiòtics (nivells de carboni orgànic, temperatura, pH, nivell d'oxigen dissolt, etc.) es poden predir [3.16].

La tècnica DGT es basa, per tant, en un simple mecanisme que acumula soluts en un agent enllaçant després de passar a través d'un gel que actua com una capa de difusió ben definida, tal com es veu en la **figura 3.1**. La resina, l'agent enllaçant, es troba immobilitzada en una capa de gel (gel enllaçant) i separada de la dissolució per una capa de gel permeable als ions (gel de difusió) amb un gruix  $\Delta g$ . Entre el gel de difusió i la dissolució d'origen es crea una capa difusiva divisòria (DBL), de gruix  $\delta$ , on el transport de ions es dóna únicament per difusió molecular. Al cap de pocs minuts d'immersió, s'estableix un gradient de concentració lineal entre la dissolució i el gel amb la resina. El flux,  $J$  ( $\text{mol cm}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), d'un ió a través del gel està determinat per la primera llei de difusió de Fick (**equació 3.1**), on  $D$  és el coeficient de difusió ( $\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$ ) i  $dC/dx$  ( $\text{mol cm}^{-4}$ ) és el gradient de concentració.



**Figura 3.1.** Representació esquemàtica de la secció d'un dispositiu DGT en contacte amb la dissolució, on es mostra el gradient de concentració que es crea. La capa de difusió es mostra com una simple capa de gel, però sol ser la capa de gel i el filtre. El gruix de la capa difusiva de límit (DBL) en la dissolució depèn del flux de l'aigua.

$$J = D \frac{dC}{dx} \quad \text{(Eq. 3.1)}$$

Si els coeficients de difusió dels ions en el gel són iguals que en l'aigua, el flux està determinat per l'**equació 3.2**, on  $C$  ( $\text{mol cm}^{-3}$ ) és la concentració en la dissolució inicial d'un ió i  $C'$  és la concentració en la interfície entre el gel enllaçant i el gel de difusió.

$$J = \frac{D \cdot (C - C')}{(\Delta g + \delta)} \quad (\text{Eq. 3.2})$$

Si els ions metàl·lics lliures es troben en equilibri ràpid amb l'agent enllaçant, amb una constant gran,  $C'$  és efectivament zero, ja que l'agent enllaçant no està saturat. En dissolucions ben agitadaes, el gruix de la capa divisòria ( $\delta$  en cm) és negligible respecte al gruix de la capa de difusió ( $\Delta g$  d'aproximadament 0,1 cm). L'**equació 3.2** es pot simplificar, per tant, en l'**equació 3.3** [3.11].

$$J = \frac{D \cdot C}{\Delta g} \quad (\text{Eq. 3.3})$$

A la pràctica, el dispositiu DGT s'exposa a la dissolució durant un temps determinat ( $t$  en segons). Un cop passat el temps d'exposició, es desmunta i es retira la capa de difusió per poder mesurar la massa d'ions acumulats en el gel enllaçant. Aquesta es pot mesurar directament en la capa de gel enllaçant per assecatge i mesura per ablació amb làser i ICP-MS, però és més habitual l'elució dels ions amb un volum conegut ( $V_e$  en mL) de dissolució ( $\text{HNO}_3$  1 M en el cas de la resina Chelex). La concentració d'ions en l'eluent ( $C_e$ ) es pot mesurar per qualsevol tècnica analítica que sigui apropiada. L'elució dels anàlits no es realitza completament, la relació entre el metall eluït i el retingut s'anomena *factor d'elució* ( $f_e$ ) i per als metalls objecte d'estudi és 0,8 quan s'utilitza  $\text{HNO}_3$  1 M per eluir els metalls de la resina Chelex [3.11]. Tenint en compte el factor d'elució, es pot calcular la massa d'ions acumulats en la capa enllaçant ( $M$  en mols) a partir de l'**equació 3.4**, on  $V_g$  és el volum de gel (mL) en la capa enllaçant. Aquesta massa d'ions acumulats ( $M$ ) es pot utilitzar per calcular el flux a través de l'àrea d'exposició de la capa de difusió ( $A$ ) en l'**equació 3.5**.

$$M = \frac{C_e \cdot (V_g + V_e)}{f_e} \quad (\text{Eq. 3.4})$$

$$J = \frac{M}{A \cdot t} \quad (\text{Eq. 3.5})$$

De la combinació de les **equacions 3.3** i **3.5** trobem l'**equació 3.6**, que indica que la concentració en la dissolució inicial es pot calcular a partir dels valors coneguts de  $\Delta g$ ,  $D$ ,  $A$ , el temps d'exposició i la massa de metall acumulada en la resina [3.11].

$$C = \frac{M \cdot \Delta g}{D \cdot t \cdot A} \quad (\text{Eq. 3.6})$$

El fet que la concentració es calculi a partir de la massa de metall acumulada i del temps d'exposició fa que sigui una tècnica molt apropiada per a l'ús *in situ*. La relació de la concentració externa i la massa mesurada està determinada pels valors de  $\Delta g$  i  $A$ , que són simples mesures geomètriques, i el coeficient de difusió en el gel, que està fixat per a cada temperatura. No depèn de la concentració d'altres compostos en la dissolució i, per altra banda, no és necessari el calibratge individual en els diferents medis.

Amb aquesta tècnica es mesuren espècies dissoltes de mida molecular suficientment petita per travessar els porus del gel de la capa de difusió; les molècules de mida més gran trobaran impedida la seva difusió [3.11]. Com que s'utilitza un gel de poliacrilamida, la mida de porus del gel de difusió permetrà que difonguin lliurement els ions metàl·lics lliures, els complexos inorgànics i els orgànics de mida petita, excloent partícules i col·loides que no seran mesurats. En resum, el dispositiu DGT mesurarà espècies dissoltes làbils de mida molecular inferior a la mida de porus del gel. Utilitzant gels amb mides de porus diferents podem aconseguir altres discriminacions [3.12]. Zhang estudia l'ús de diferents gruixos de capa de difusió amb els quals aconseguix diferenciar espècies metàl·liques [3.10].

Les fases enllaçants utilitzades varien en funció de les espècies que volem mesurar i normalment es tracta d'una fase sòlida que enllaça fortament l'anàlit d'interès sota les condicions d'exposició, impregnada en un gel de poliacrilamida. La fase enllaçant més explotada és una resina quelant d'iminodiacetat (Chelex-100) impregnada en un gel de poliacrilamida per a la mesura de metalls traça [3.22]. Per a aquesta situació, s'han realitzat estudis per establir l'efecte de la temperatura, pH i força iònica: treballant en un interval de temperatura d'entre 5 i 35 °C, podem interpretar els resultats obtinguts mitjançant la tècnica DGT utilitzant els coeficients de difusió en aigua. Segons les experiències que es reporten a la bibliografia, la concentració mesurada per la tècnica DGT és independent de la força iònica de la solució. L'efecte del pH es basa en les propietats de la resina Chelex-100, que enllaça menys eficientment els metalls a pH baixos i es veu que les recuperacions es redueixen quan el pH de la dissolució és inferior a 5 i encara es redueixen més quan disminueix a pH 2-3. De tota manera, podem ampliar l'interval de pH de treball escollint una altra resina amb característiques diferents [3.11].

S'han utilitzat altres fases enllaçants per a la determinació de metalls, com membranes de bescanvi iònic de fosfat de cel·lulosa [3.23] o fases enllaçants líquides, com solucions de poli(4-estirenosulfonat) [3.24- 3.26]. Altres materials enllaçants s'han impregnat en el gel de poliacrilamida, per exemple AgI per enllaçar sulfurs [3.27- 3.29].

L'objectiu d'aquest treball és obtenir informació del possible efecte de la contaminació per metalls al mar Menor, zona afectada per la mineria. En aquest sentit, s'han realitzat diferents aproximacions:

- S'han utilitzat organismes per avaluar l'acumulació dels metalls i estudiar la relació amb la concentració de metall present en el sediment i el seu fraccionament. S'han fet experiments de camp utilitzant biofilm desenvolupat al mar Menor i experiments al laboratori exposant algues del gènere *Ulva*, desenvolupades en llocs lliures de contaminació, a sediments i aigua del mar Menor.
- S'ha mesurat la concentració de metalls en organismes situats en posicions més elevades de la xarxa tròfica (diferents espècies de peixos i escopinyes) per posar de manifest possibles efectes de biomagnificació.
- S'ha avaluat l'ús de la tècnica DGT per mesurar el metall biodisponible a l'aigua del mar Menor. Els resultats d'aquesta tècnica s'han comparat amb els resultats d'aplicar la voltametria de redissolució anòdica a l'anàlisi de l'aigua del mar Menor.



## 3.2. EXPERIMENTAL

### 3.2.1. Equips i reactius

S'ha utilitzat un ICP-OES (Liberty RL, Varian) amb un nebulitzador de tipus en V per a la determinació de zinc, plom, cadmi, coure, níquel i arsènic en les digestions de les mostres. Les longituds d'ona de treball seleccionades van ser: Zn (202,551 nm), Pb (220,353 nm), Cd (214,438 nm), Cu ( 324,754 nm), Ni (221,647 nm) i As (193,696 nm). Les mostres amb concentracions a nivells traça dels metalls s'han analitzat mitjançant un ICP-MS (Agilent 7500c, Agilent Technologies). Per a la determinació de metalls en aigua de mar s'ha emprat un instrument de polarografia/voltametria 797 VA Computrace (Metrohm), equipat amb un elèctrode de gota de mercuri (HMDE) com a elèctrode de treball, un elèctrode de Ag/AgCl (KCl) com a elèctrode de referència i un fil de Pt com a elèctrode auxiliar. S'utilitza un tampó acetat per ajustar el pH a 4,6. Els paràmetres voltamètrics són: potencial de deposició -1.150 mV durant 60 segons i l'escombratge es realitza des de -1.150 mV fins a +100 mV ( $59,5 \text{ mV s}^{-1}$ ).

Per a les digestions àcides de les mostres s'ha utilitzat un microones Milestone Ethos Plus (Gomensoro, SA) amb control de temperatura, reactors de tefló i de quars. Per a la mesura i ajust del pH, quan es requeria, s'ha fet servir un pH-metre Crison GLP22.

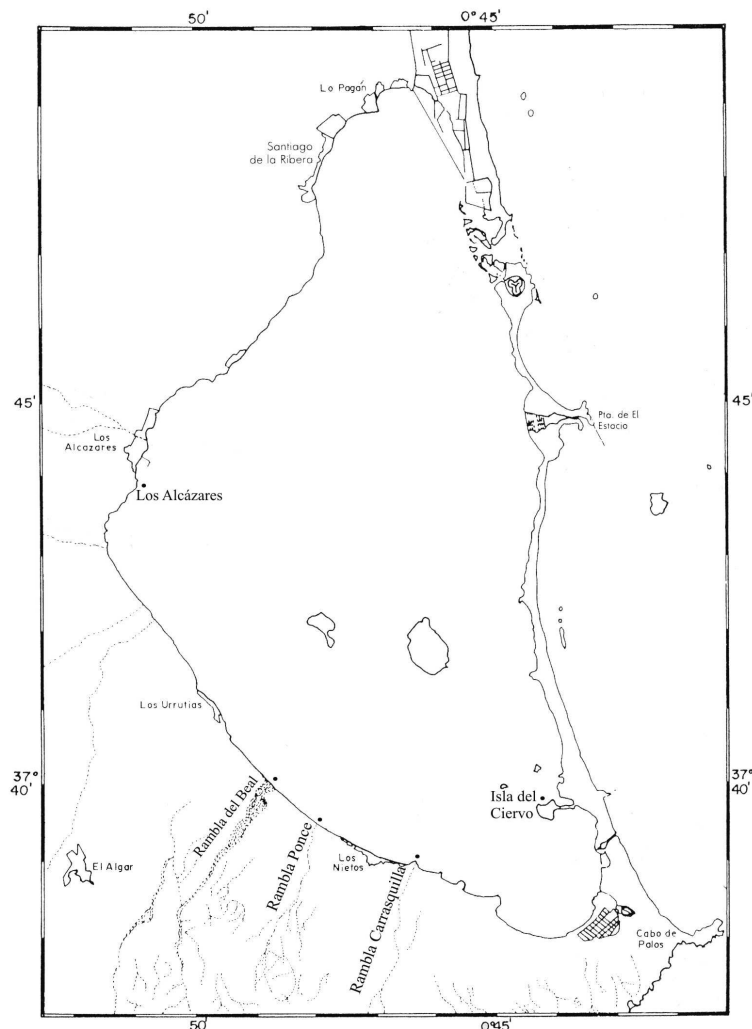
Els dispositius DGT han estat proporcionats per DGT Research (Lancaster, Regne Unit). Aquests estaven compostos per un suport de plàstic circular en forma de pistó, discos de gel de difusió de 0,8 mm de gruix i la resina enllaçant Chelex-100. S'han utilitzat filtres de membrana de nitrat de cel·lulosa amb una mida de porus de  $0,45 \mu\text{m}$  de Millipore.

Tots els reactius utilitzats són de qualitat per a anàlisi o suprapurs. S'utilitza EDTA (Panreac) per al tractament de les mostres de biofilm i algues i àcid nítric i peròxid d'hidrogen (Merck i Sigma-Aldrich, respectivament) per a les digestions. Els patrons dels metalls es preparen per dilució de les solucions estoc ( $1.000 \text{ mg L}^{-1}$ ) de cada element (Spectrascan).

### 3.2.2. Procediment experimental

#### 3.2.2.1. Presa de mostres

S'han recollit mostres en diferents punts del mar Menor (**figura 3.2**). Principalment s'han estudiat les desembocadures de tres de les rambles que drenen la Sierra de Cartagena (Beal, Ponce i Carrasquilla), ja que són les principals introductores de metall al mar Menor, i com a punts de referència s'han utilitzat un punt de la zona sud del mar Menor però allunyat de la zona de descàrrega de les rambles (Isla del Ciervo) i un punt més al nord (Los Alcázares).



**Figura 3.2.** Mapa de localització dels punts de presa de mostra.

En el cas dels biofilm, aquests s'han desenvolupat al mar Menor mitjançant la immersió d'uns vidres en aquest durant un mes i mig, aproximadament. En cada punt de mostreig s'han disposat suports en contacte amb el sediment i en la columna d'aigua.

S'han realitzat diferents campanyes de presa de mostra per estudiar la possible influència de l'estacionalitat en l'acumulació de metalls en el biofilm.

De manera semblant als biofilm, els dispositius DGT s'han situat en els diferents punts del mar Menor durant tres dies per determinar la concentració mesurada mitjançant aquesta tècnica en l'aigua de mar. També s'han realitzat experiments al laboratori, reproduint condicions similars a les del camp.

Les algues (*Ulva lactuca*) han estat recollides a Palamós, de manera que ens assegurem que no estan afectades per contaminació metàl·lica, i al laboratori s'han exposat a aigua i sediment del mar Menor durant una setmana per estudiar l'acumulació de metalls.

Finalment, també s'han recollit mostres de diferents espècies de peixos provinents del mar Menor (*Diplodus anularis*, *Mugil cephalus* i *Diplodus sargus*) i escopinyes (*Cerastoderma edule glaucum*), per determinar-ne el contingut en metalls.

### 3.2.2.2. Estudi de l'acumulació de metalls en biofilm

El biofilm es desenvolupa sobre uns vidres de mida aproximada  $10 \times 15$  cm muntats sobre un suport de metacrilat, tal com es pot observar a la **figura 3.3**. Aquests vidres es van deixar submergits a la columna d'aigua i en contacte amb el sediment durant un mes i mig en cada punt de mostreig, tal com s'indica a la **figura 3.3**. Un cop recollim aquests vidres, es porten al laboratori, refrigerats. Al laboratori, el procediment que se segueix és el que es descriu a continuació [3.7, 3.8]:

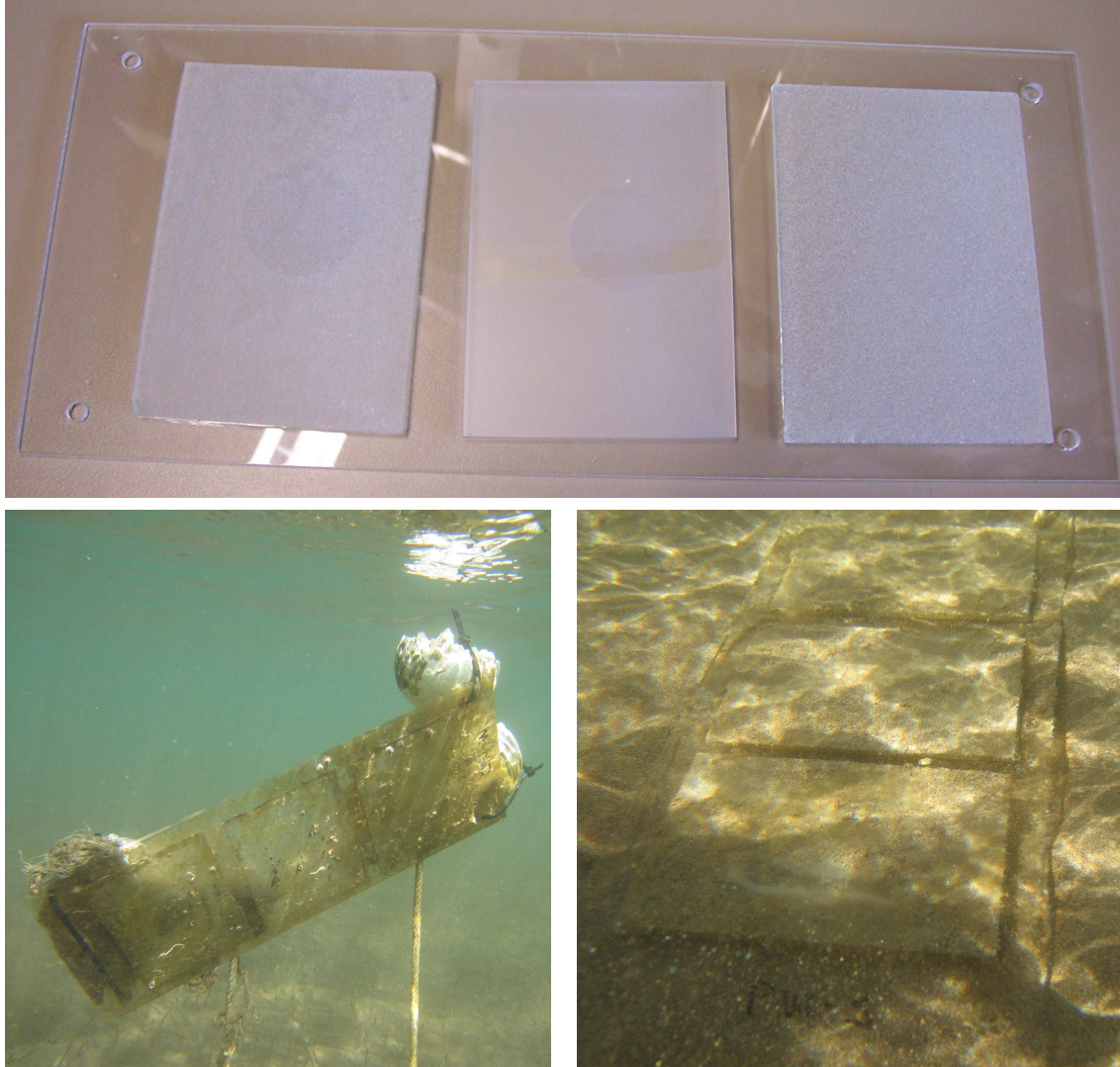
- 1- Les mostres de biofilm són suspeses en aigua de mar filtrada ( $0,45 \mu\text{m}$ ).
- 2- Se separen les partícules de sediment (material inorgànic) per decantació (2-3 rentatges amb aigua de mar filtrada).

Es fan dues alíquotes de cada mostra: una que segueix el protocol (3) i una altra a la qual es fa un rentatge amb EDTA per treure'n el metall sorbit (3')

- 3- Es filtra a través d'un filtre de nitrat de cel·lulosa  $0,45 \mu\text{m}$  rentat amb àcid.
- 3'- Es tracta amb EDTA 4 mM (concentració final) a pH 8 durant 10', i posteriorment es passa al pas 3 (filtració).
- 4- S'assequen els filtres a  $50^\circ\text{C}$  durant 15 hores i determinem el pes de biofilm sec.
- 5- Digestió assistida per microones: 5 ml  $\text{HNO}_3$  65 % + 1 ml  $\text{H}_2\text{O}_2$  30 % (digestió de biofilm i filtre). La rampa de temperatura utilitzada ha estat: en 3 minuts s'arriba a

85 °C, increment de la temperatura fins a 145 °C durant 9 minuts, en 4 minuts s'arriba a 200 °C, que es mantenen durant 14 minuts.

6- Determinació dels metalls mitjançant ICP-OES.



**Figura 3.3.** Imatge dels vidres muntats sobre el suport de metacrilat (imatge superior) per a la seva posterior col·locació en cada punt, com es pot veure a la part inferior: a la columna d'aigua (imatge esquerra) i en contacte amb el sediment (imatge dreta).

El contingut de metall és diferent segons la fracció. D'aquesta manera podem definir operacionalment [3.7, 3.8]:

- Metall intracel·lular: contingut de metall determinat després del rentatge amb EDTA

- Metall sorbit: es calcula com la diferència entre el contingut de metall abans i després de rentar amb EDTA.
- Metall total: contingut de metall determinat en la fracció no tractada amb EDTA.

### 3.2.2.3. Acumulació de metalls en algues verdes

Les algues (*Ulva lactuca*) han estat recollides a Palamós, i s'ha exposat aquests individus a aigua del mar Menor i sediment dels diferents punts de mostreig. En cada recipient es disposava sediment i aigua de mar i s'exposaven les algues de manera que es trobessin prop del sediment, però evitant el contacte directe (**figura 3.4**). D'aquesta manera es deixen durant una setmana. Passat aquest temps d'exposició, es renten per eliminar les partícules de sediment i es realitza un tractament amb EDTA per eliminar el metall que pugui estar sorbit superficialment (tal com s'ha descrit en el cas dels biofilm). Posteriorment s'assequen i es fa una digestió assistida per microones per a la seva anàlisi (el procediment és el mateix que el que seguim en el cas de les mostres de biofilm).



**Figura 3.4.** Exposició de les algues (*Ulva lactuca*) a sediment i aigua del mar Menor en condicions controlades al laboratori.

### 3.2.2.4. Determinació de l'acumulació de metalls en peixos i bivalves

S'han estudiat tres espècies diferents de peixos (*Diplodus anularis*, *Mugil cephalus* i *Diplodus sargus*) i escopinyes (*Cerastoderma edule glaucum*), com podem veure a la **figura 3.5**. S'han obtingut mostres de múscul en el cas dels peixos i de teixit tou dels bivalves i s'han liofilitzat i digerit per a la seva anàlisi posterior. La digestió assistida per microones s'ha realitzat amb 8 ml HNO<sub>3</sub> 65 % i 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %. La rampa de temperatura utilitzada ha estat: en 2 minuts s'arriba a 85 °C, increment de la temperatura fins a 145 °C durant 5 minuts, en 3 minuts s'arriba a 210 °C, que es mantenen durant 10 minuts.



**Figura 3.5.** Imatge dels organismes marins que hem estudiat, de dreta a esquerra: *Diplodus anularis*, *Mugil cephalus*, *Diplodus sargus* i *Cerastoderma edule glaucum*.

### 3.2.2.5. Determinació de metalls mitjançant la tècnica DGT

S'han utilitzat dispositius DGT basats en un mecanisme de pistó amb una finestra d'exposició de 2 cm de diàmetre per a tots els experiments. Aquests s'han muntat utilitzant tots els components humits per evitar la formació de bombolles d'aire dins el sistema. Sobre la superfície del pistó es diposita, en primer lloc, la capa de gel amb la resina orientada cap amunt; a sobre d'aquesta es col·loca la capa de gel de difusió i, finalment, el filtre de membrana de nitrat de cel·lulosa amb una mida de porus de 0,45 µm. Finalment, es col·loca el tap del pistó amb la finestra d'exposició pressionant fins a tenir tot el mecanisme ben segellat [3.10]. El filtre s'utilitza perquè en sistemes naturals es poden trobar partícules fines que es podrien adherir a la superfície de gel exposada, però no a un filtre de membrana [3.11].

Hem realitzat diferents experiments. Per una banda hem aplicat la tècnica DGT al laboratori en condicions controlades per mesurar la concentració de metalls en l'aigua del mar Menor, tant exposant aquesta a sediment com sense realitzar exposició. Per altra banda, hem emprat dispositius DGT *in situ*, en condicions similars al laboratori, per veure

les diferències entre els punts estudiats. A la **figura 3.6** es mostra la col·locació dels dispositius DGT per a aquests experiments.

Les aplicacions s'han realitzat sempre per a un període d'exposició de 72 hores. En cada cas s'ha tingut en compte el temps exacte de l'aplicació i s'ha mesurat la temperatura per definir el coeficient de difusió que s'ha d'introduir en el càlcul de la concentració de metalls.

Un cop acabada l'exposició, s'esbandeix bé el dispositiu amb aigua bidestil·lada per eliminar qualsevol partícula que pugui tenir, i es desmunta per retirar la resina. Es deixa en contacte amb àcid nítric 1 M durant com a mínim 24 hores per a l'elució dels metalls que estiguin retinguts, i posteriorment s'analitza mitjançant ICP-MS [3.10].



**Figura 3.6.** Exposició dels dispositius DGT a aigua i sediments del mar Menor. A l'esquerra, experiments al laboratori, i a la dreta, experiments de camp.

---

### 3.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

#### 3.3.1. Estudi de l'acumulació de metalls en biofilm

Les observacions de les mostres de biofilm al microscopi indiquen que aquest es compon fonamentalment d'algues, concretament diatomees. No s'han observat bacteris en les poblacions estudiades. S'han observat diferències en el desenvolupament del biofilm depenent de la profunditat on se situen i de la localització. Així, la població és molt més abundant en el vidre situat en la columna d'aigua que en el que es troba directament sobre el sediment. Quant als diferents punts de mostreig, clarament hi ha molta més població a Carrasquilla que a la resta de punts, mentre que a Beal és on trobem menys població.

De cadascun dels suports situats amb l'objectiu de fer la determinació de la concentració de metalls es van obtenir tres submostres de biofilm, una de cada vidre, per fer la determinació per triplicat. Els resultats que es mostren a la **figura 3.7** són la mitjana d'aquests tres replicats per a les determinacions del metall total i l'intracel·lular; per al metall sorbit s'ha fet la diferència de les mitjanes. La nomenclatura de les mostres correspon al punt de col·locació del vidre al mar Menor, és a dir, amb la inicial del punt de mostreig: R, P, C i B que corresponen al punt de referència, Ponce, Carrasquilla i Beal, respectivament. També s'ha indicat la profunditat en la qual es va desenvolupar el biofilm amb una S i una W, que corresponen al biofilm desenvolupat més a prop del sediment o el desenvolupat a la columna d'aigua, respectivament. Finalment, el nombre indica la campanya que s'estudia: febrer del 2004 i febrer del 2006 (1 i 3, respectivament).

El metall total correspon a la suma del metall que es troba sorbit a la superfície del biofilm i a l'assimilat. El metall intracel·lular (en blau) és el metall que el biofilm acumula al seu interior, que es determina després de sotmetre el biofilm a un tractament amb EDTA, mitjançant el qual complexem el metall sorbit a la seva superfície. El metall sorbit (en vermell) es determina per diferència entre el metall total i l'intracel·lular. D'aquesta manera, la dada que més ens interessa és la del metall intracel·lular o bioacumulat pel biofilm, en la qual veiem que no s'aprecien gaires diferències entre el biofilm exposat al sediment o l'exposat a la columna d'aigua únicament. En alguns casos la concentració és major en el biofilm desenvolupat més a prop del sediment.



Als gràfics de la **figura 3.7** es pot observar que el comportament de Pb i Zn és similar, mentre que el comportament del Cd és molt diferent. El nivell de les concentracions per a aquest darrer metall és també molt inferior, perquè els metalls explotats a les mines de la zona eren Pb i Zn, mentre que el Cd es troba com a impuresa a concentracions molt menors. Les concentracions determinades en el biofilm en la primera i tercera campanyes (febrer del 2004 i febrer del 2006) són superiors a les que es van trobar en la segona (agost del 2004; en aquesta campanya només es van aconseguir mostres de biofilm desenvolupat en el punt de referència i a la desembocadura de Ponce, i per aquest motiu no s'han representat en els gràfics). El primer i tercer mostreigs se situen en èpoques de recàrrega de residus a través de les rambles i de remobilització del sediment tant per episodis esporàdics de pluja com pel vent. En general, les concentracions en el biofilm desenvolupat en el punt de referència sempre són baixes i molt inferiors a la del biofilm desenvolupat a la desembocadura de les rambles. Normalment, el biofilm desenvolupat a la desembocadura de la rambla de Beal és el que presenta les majors concentracions de metall acumulat, seguit del biofilm desenvolupat a la desembocadura de Ponce i Carrasquilla.

Les concentracions de metall intracel·lular (determinat després del tractament amb EDTA) són similars a les concentracions de metall total. El Pb intracel·lular representa del 70 % al 100 % del metall total, tot i que hi ha alguna mostra de biofilm desenvolupat en el punt de referència en la qual aquest es redueix fins a un 20 %. El Zn i el Cd intracel·lular representen entre el 50 % i el 100 % del metall total. Hem de remarcar la presència d'una mostra de biofilm desenvolupat a la desembocadura de Ponce en contacte amb el sediment en el primer mostreig, en el qual el metall intracel·lular representa uns percentatges molt menors que els que hem indicat, 50 % per a Pb i Zn i 19 % per a Cd. Aquesta mostra presenta les concentracions totals de Pb i Zn més elevades, però si considerem el metall intracel·lular, aquest és similar o lleugerament inferior al determinat en el biofilm desenvolupat a la desembocadura de Beal.

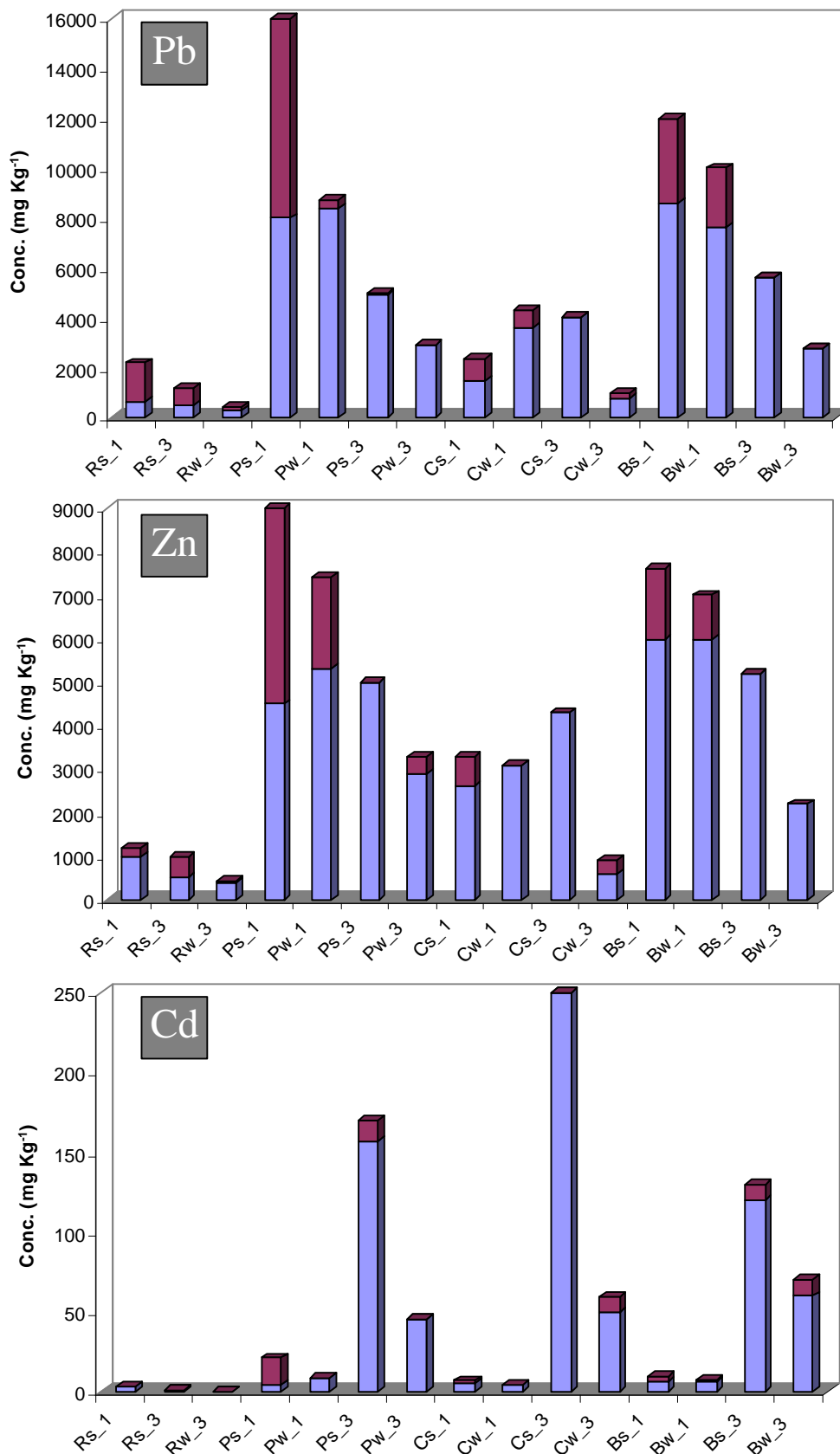


Figura 3.7. Resultat de la determinació de metall en biofilm, en blau el metall intracel·lular i en vermell el metall sorbit a la superfície del biofilm.

Un dels objectius d'aquest estudi és investigar les relacions entre els resultats de bioacumulació de metalls en biofilm i les característiques fisicoquímiques del sediment, concretament amb els resultats de l'aplicació de l'esquema d'extracció seqüencial BCR sobre els sediments on es van desenvolupar les comunitats perifíctiques (**capítol 1**). D'aquesta manera veiem que es poden relacionar els resultats del metall acumulat en el biofilm amb la fracció de metall intercanviable i soluble en àcid (primera etapa del BCR) en la fracció fina del sediment. En el cas de Pb i Zn, les majors concentracions extretes en la primera etapa corresponen al sediment de la desembocadura de Ponce i Beal, mentre que en els sediments de Carrasquilla i referència les concentracions extretes a la primera etapa són força inferiors, de la mateixa manera que en els resultats del metall acumulat pels biofilm. Per a Cd, les mostres de biofilm del tercer mostreig presenten unes concentracions molt més elevades que les dels mostreigs anteriors. Tot i així, veiem que en general les concentracions de metalls en el biofilm desenvolupat en les tres rambles estudiades són majors que en el biofilm desenvolupat en el punt de referència, de la mateixa manera que trobàvem en l'extracció dels metalls en la primera etapa del BCR en la fracció fina del sediment.

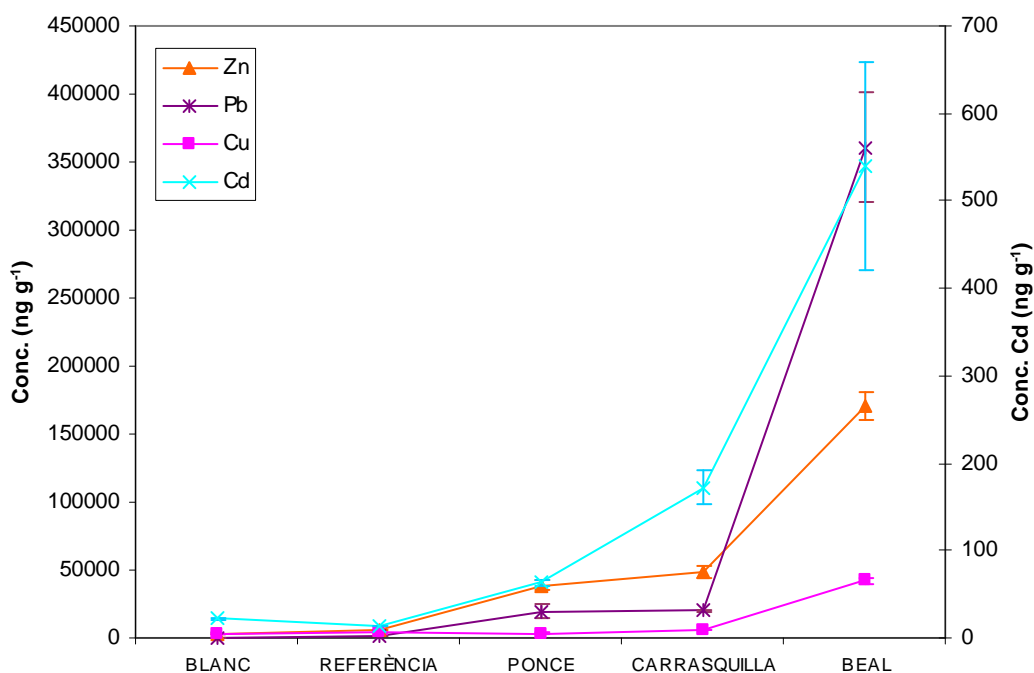
Tot i que els sediments s'han utilitzat sovint com a indicadors de la contaminació, pocs estudis han investigat la seva relació amb el biofilm. Un d'aquests estudis és el de Holding et al. [3.30] en el qual es trobaven relacions similars a les d'aquest estudi i arribaven a la conclusió que el biofilm pot ser un biomonitor útil per determinar la mobilitat potencial i la toxicitat de metalls traça en sistemes aquàtics, especialment quan s'utilitza conjuntament amb les dades del sediment.

### **3.3.2. Acumulació de metalls en algues verdes**

En experiments de laboratori s'han exposat algues verdes (*Ulva lactuca*) al sediment provinent dels quatre punts del mar Menor objecte d'estudi durant una setmana. Al mateix temps, també s'ha exposat les algues a sediment del mateix punt d'on provenen (costa de Palamós), que s'ha pres com a referència (blanc). Els resultats de la determinació de metalls en les algues es representen en la **figura 3.8**.

Es pot observar que la concentració de metalls, principalment Pb, Zn i Cd, augmenta en les algues exposades al sediment provinent de la desembocadura de les rambles que drenen la serra minera. També es pot veure que l'augment més pronunciat es

dóna per l'exposició al sediment de la desembocadura de la rambla de Beal, zona més contaminada, com ja s'ha vist anteriorment. El comportament general d'acumulació de metalls de les algues és similar al que s'observa per als biofilm. Les concentracions en aquest cas són inferiors a les que es troben en els biofilm, probablement a causa de diferències en les condicions d'exposició.



**Figura 3.8.** Resultat de la determinació de metall en algues, mitjana de dos replicats. Pb, Zn i Cu es referencien a l'eix principal, mentre que el Cd es referencia a l'eix secundari (dreta).

Conti i Cecchetti [3.5] en el seu treball sobre monitorització en punts de la costa italiana, utilitzen l'alga *Ulva lactuca* i determinen la concentració de metalls acumulada. Segons els mateixos autors, l'àrea estudiada no es troba lliure d'activitats industrials i, per tant, no es pot considerar una zona no contaminada. Les concentracions de metalls determinades en l'alga es troben en els intervals 0,13-0,21, 4,9-6,4, 1,67-2,28 i 37-54 mg kg<sup>-1</sup> de Cd, Cu, Pb i Zn, respectivament. Queda palès que el fet d'exposar aquestes algues a l'aigua i sediments del mar Menor fa augmentar com a mínim un ordre de magnitud la concentració de metalls acumulada. Aquest fet evidencia l'elevada contaminació d'aquesta zona.

En aquest mateix treball [3.5] troben que l'acumulació de metalls varia en l'ordre  $Zn > Cu > Pb > Cd$ . Aquesta no és la seqüència que trobem en el nostre estudi, que és  $Pb \geq Zn > Cu > Cd$ . Suposem que això és degut a les característiques especials de la zona, que, com ja hem vist, presenta concentracions molt elevades tant de Pb com de Zn. D'aquesta manera, veiem que ens trobem en una zona caracteritzada per una contaminació molt elevada i de difícil comparació amb cap altre treball que, segons el nostre coneixement, s'hagi publicat fins ara.

### 3.3.3. Determinació de l'acumulació de metalls en peixos i bivalves

Els resultats obtinguts en la determinació de metalls en peixos i escopinyes es recullen a la **taula 3.1**. Es pot observar que les concentracions són baixes per a la majoria de metalls, sobretot en els peixos (segurament a causa del fet que hem analitzat el múscul, mentre que la major acumulació de metalls en els peixos es produeix al fetge). Les concentracions en escopinyes són molt superiors a les concentracions trobades en peixos, ja que viuen directament sobre el sediment, per la qual cosa es troben més influenciades per aquest. A més, són organismes que filtren gran quantitat d'aigua i ingereixen partícules potencialment enriquides en metalls, cosa que reflecteix l'entrada de residus miners a través de les rambles, així com la resuspensió dels continguts en el sediment. L'ordre d'acumulació de metalls per a les escopinyes és  $Cu > Zn > Ni > Pb > Sn > Cd$ . Com veiem, el comportament és diferent del que observàvem per a algues i biofilm, segurament perquè per a aquests és necessari que el metall es desorbeixi del sediment i passi a estar en solució, mentre que les escopinyes, com que són organismes filtrants, poden assimilar el metall directament del sediment. Segurament també influenciarà l'afinitat per a determinats metalls, ja que la concentració de Cu en el sediment sempre és inferior a la de Pb i Zn. No estem observant només les diferents estratègies d'acumulació de metalls dels organismes davant cada metall, sinó que també tenen un paper important els requeriments fisiològics de metalls essencials.

En el cas dels peixos, l'espècie que presenta concentracions de metalls més elevades és el *Mugil cephalus*, tot i que les tres espècies presenten concentracions força similars. En aquest cas, l'ordre d'acumulació dels metalls és  $Zn > Cu > Pb > Sn \geq Cd \geq Ni$ . Com veiem, aquest ordre és diferent del de les algues i biofilm i també del que trobàvem per a les escopinyes. En general, el Cd és un metall acumulat a baixes concentracions en

els organismes estudiats i els més acumulats són Pb, Zn i Cu, depenent de cada organisme en particular. D'aquesta manera, les concentracions de metalls trobades en el múscul dels peixos es troben dins dels intervals descrits en altres àrees contaminades del Mediterrani [3.31- 3.34]. Així tal com apuntava De León [3.35], mentre que Pb i Zn s'acumulen en els bivalves que habiten al mar Menor, les concentracions d'aquests metalls en peixos i aigua no difereixen d'altres àrees del Mediterrani.

**Taula 3.1.** Resultats de la determinació de metalls en animals marins provinents del mar Menor. Les concentracions s'expressen en ng g<sup>-1</sup>; són la mitjana de dues determinacions ± SD.

	[Pb]	[Zn]	[Cd]	[Cu]	[Ni]	[Sn]
<i>M. cephalus</i>	280 ± 50	13.400 ± 800	<5,64	7.600 ± 400	<5,13	11 ± 1
<i>D. sargus</i>	190 ± 30	9.000 ± 2.000	<5,58	7.000 ± 2.000	<5,07	<5,45
<i>D. anularis</i>	340 ± 30	9.800 ± 50	<5,64	5.690 ± 40	<5,12	<6,15
<i>C. edule</i>	3.300 ± 200	35.000 ± 6.000	<12,94	120.000 ± 30.000	28.000 ± 7.000	2.300 ± 80

Segons la normativa de la Comunitat Europea (Directiva 2001/22/CE), els límits per a consum humà establerts es troben en 0,2 i 0,05 mg kg<sup>-1</sup> en pes fresc per a Pb i Cd, respectivament, en múscul de peix, i en 1,5 i 0,5 mg kg<sup>-1</sup> en pes fresc per als dos metalls en crustacis i bivalves. Els límits establerts per l'Organització d'Alimentació i Agricultura se situen en 30 mg kg<sup>-1</sup> en pes fresc per a Cu i Zn (FAO, 1983). Segons aquestes normatives, els peixos i escopinyes del mar Menor es troben per sobre del límit permès, per la qual cosa s'hauria de fer un estudi més detallat sobre la idoneïtat d'aquests productes per al consum humà.

### 3.3.4. Determinació de la concentració de metalls en l'aigua del mar Menor

En primer lloc, s'ha aplicat la tècnica DGT, al laboratori, per a la determinació de metalls a l'aigua del mar Menor (els resultats es troben a la **taula 3.2**). Com es pot observar, les concentracions de metall determinades a l'aigua del mar Menor són molt baixes, tot i les elevades concentracions presents tant en el sediment com en els organismes que hi habiten. Com ja hem comentat, el fet d'utilitzar la tècnica DGT ens permet reduir els límits de detecció, ja que es realitza una preconcentració dels anàlits alhora que eliminem les interferències de matriu, que, en el cas de l'aigua de mar, són força importants.

**Taula 3.2.** Resultats de l'aplicació de la tècnica DGT a la determinació de metalls en aigua del mar Menor. Les concentracions s'expressen en ng ml<sup>-1</sup>.

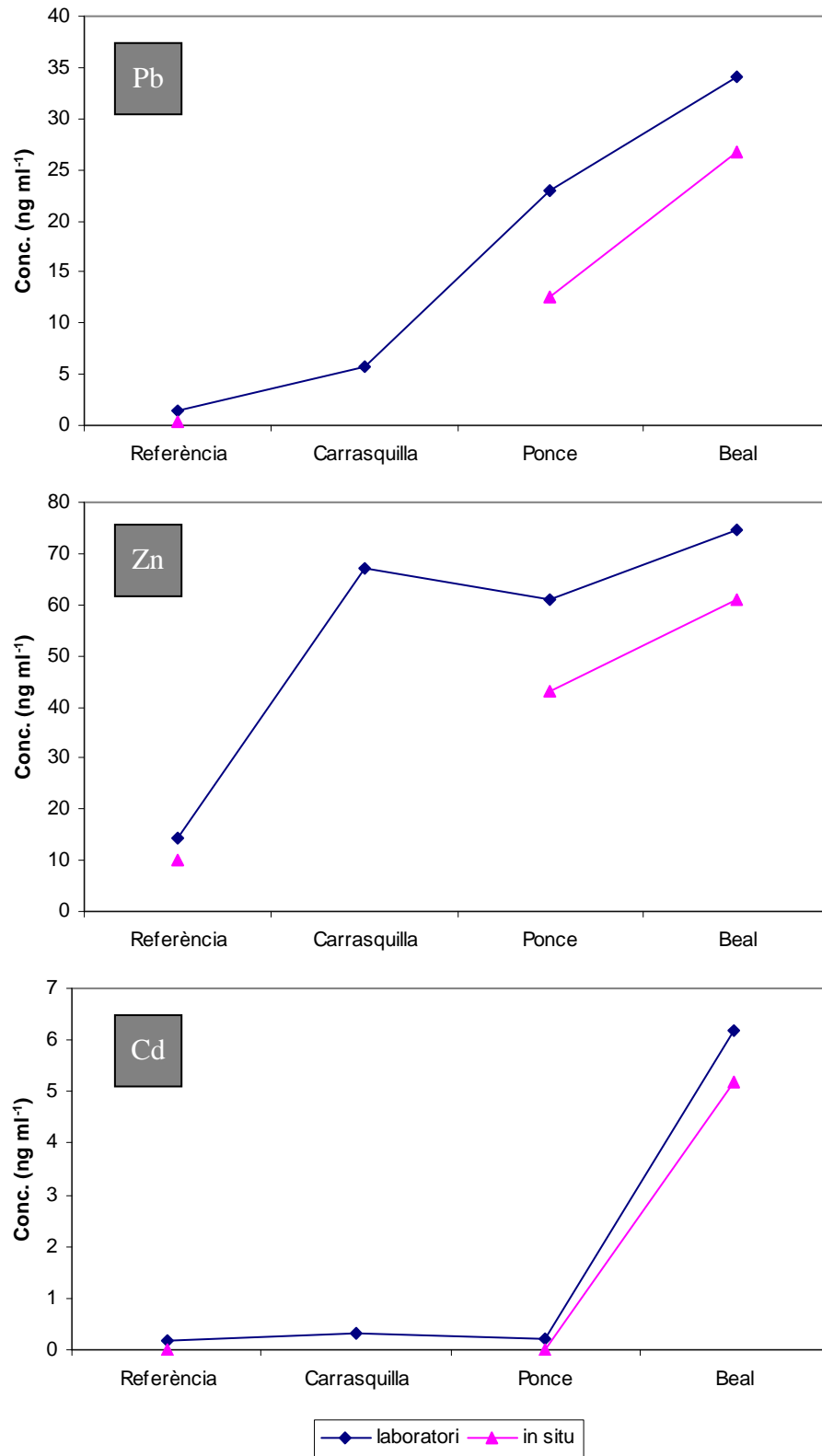
[Pb]	s.d.	[Zn]	s.d.	[Cd]	s.d.	[Cu]	s.d.	[Ni]	s.d.
5,25	0,06	8,6	0,1	0,133	0,005	3,9	0,1	1,15	0,02

Els resultats de les determinacions *in situ* i dels experiments de laboratori es poden veure a la **figura 3.9** per a Pb, Zn i Cd. En els experiments realitzats al laboratori es van aplicar els dispositius DGT a aigua del mar Menor exposada al sediment dels diferents punts estudiats i en la determinació *in situ* es van disposar els dispositius DGT en cada punt de mostreig de manera similar als biofilm, un més a prop del sediment i l'altre a la columna d'aigua. En tots els casos el temps d'exposició va ser de 72 hores.

Veiem que les concentracions de metall en l'aigua del mar Menor són inferiors en el punt de referència que en les desembocadures de les rambles. En el cas dels experiments al laboratori, quan l'aigua del mar Menor s'exposa als sediments provinents de la desembocadura de les rambles, augmenta la concentració de metalls present, sobretot quan es tracta del sediment de la desembocadura de Beal.

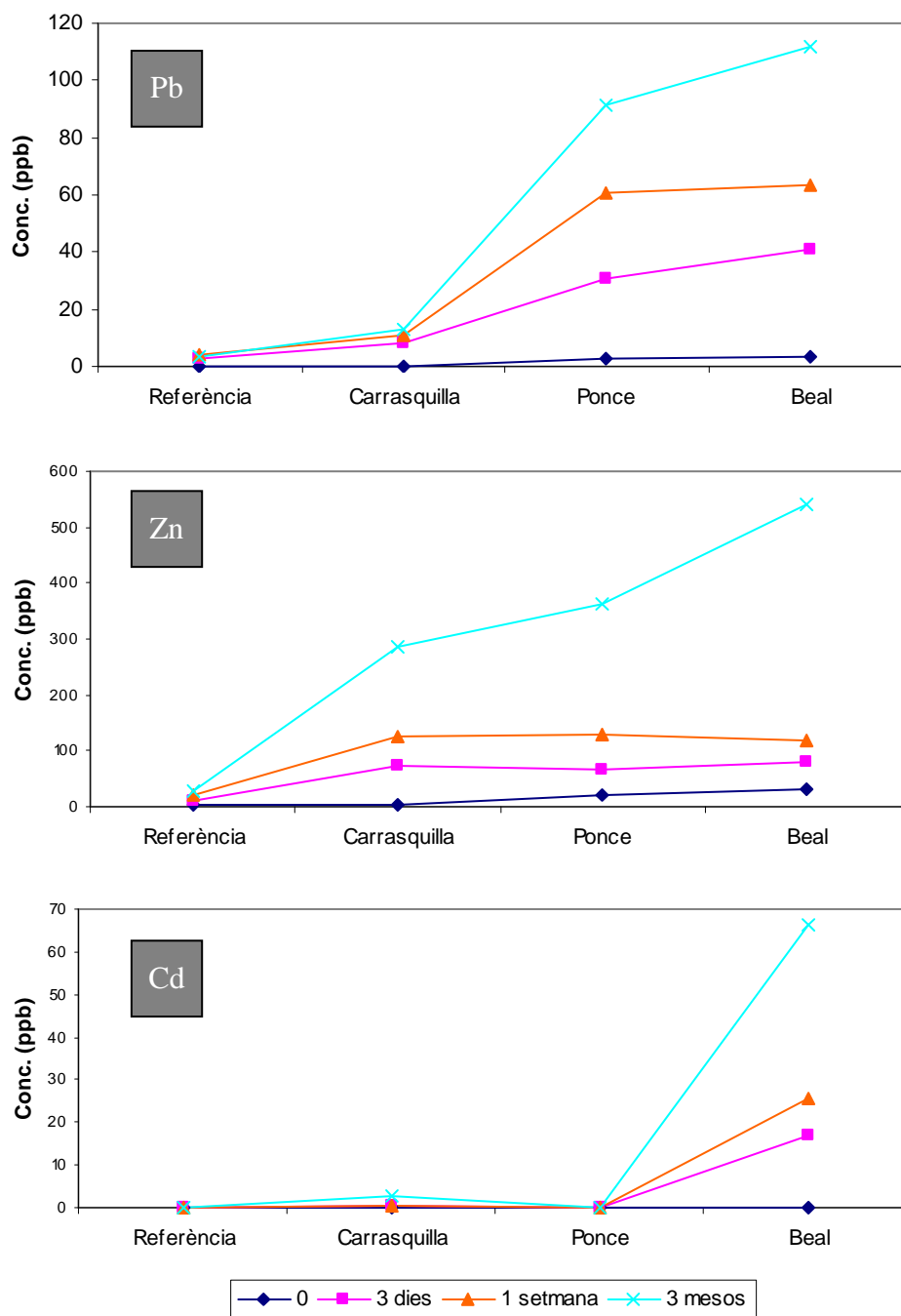
En els diferents experiments realitzats s'observa que els comportaments en l'acumulació són similars, però els resultats són diferents. Per això hem realitzat un experiment exposant l'aigua del mar Menor recollida al punt de referència a sediment dels diferents punts estudiats durant diferents períodes. S'han realitzat mesuraments a l'inici de l'experiment, al cap de tres dies, una setmana i tres mesos. En aquest cas, s'han mesurat les concentracions de metalls en l'aigua del mar Menor mitjançant voltametria de redissolució anòdica, tècnica comparable al *diffusive gradients in thin films*. Els resultats de les concentracions mesurades en l'aigua del mar Menor es troben a la **figura 3.10**.

Es pot observar que, en augmentar el temps d'exposició de l'aigua al sediment, la concentració de metalls en aquesta augmenta. Aquest augment és més pronunciat en realitzar l'exposició als sediments provinents de la desembocadura de les rambles, sobretot en el cas de Beal. Aquest increment en la concentració de l'aigua possiblement és degut a fenòmens de desorció, tal com apuntaven Cobelo-García i Prego [3.36], i s'agreuja en episodis de resuspensió del sediment. Així, tot i que la concentració en l'aigua de mar és baixa, aquesta pot augmentar de manera brusca en èpoques de pluges, en les quals els sediments es resuspenen i hi ha recàrrega de residus per part de les rambles.



**Figura 3.9.** Resultats de l'aplicació de la tècnica DGT a la determinació de Pb, Zn i Cd en aigua del mar Menor: determinació *in situ* i experiments de laboratori.





**Figura 3.10.** Evolució de la concentració de Pb, Zn i Cd en l'aigua del mar Menor segons el temps durant el qual ha estat exposada als sediments.

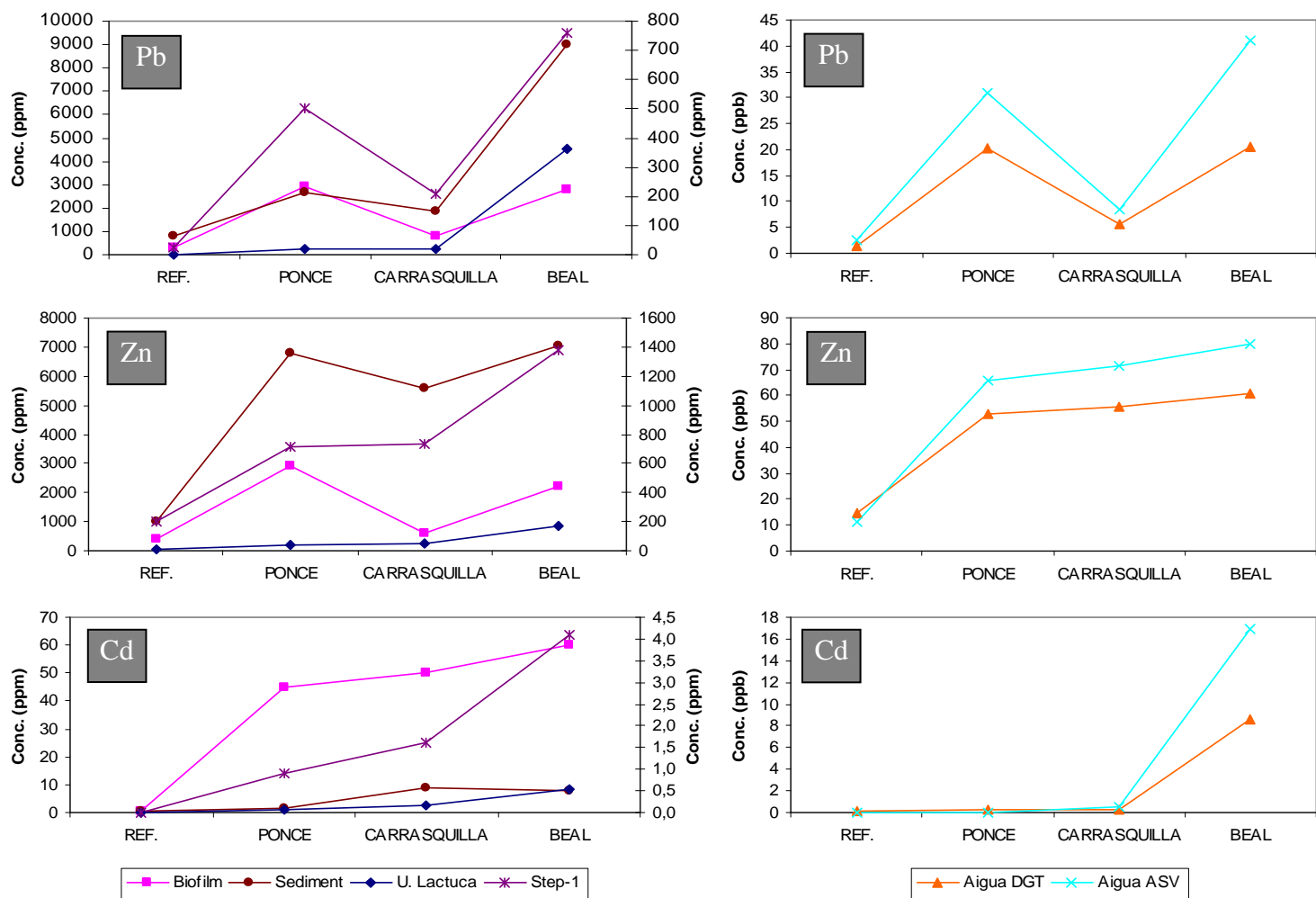
Estudis en la zona del mar Menor [3.37] durant èpoques de pluges demostren que els metalls són descarregats per les rambles i que part d'aquest metall entra en forma dissolta, principalment Zn i Cd, la qual cosa fa que les concentracions en l'aigua del mar

Menor augmentin de manera significativa. Es troben concentracions de metall dissolt de 2 ppm, 170 ppb i 70 ppb de Zn, Pb i Cd, respectivament, a l'aigua de mar de la desembocadura de la rambla de Beal durant les quatre hores posteriors a la descàrrega. A la desembocadura de la rambla Ponce aquestes concentracions de metall dissolt no són tan grans —arriben als 70 ppb de Zn—, però es mostra també un augment important de la concentració en l'aigua de mar. En períodes posteriors (48 hores), les concentracions a l'aigua de mar es normalitzen perquè els paràmetres de l'aigua de la llacuna (salinitat i pH) restableixen els seus valors normals, cosa que provoca la precipitació dels metalls dissolts, mentre que els metalls particulats perduren durant més temps i afecten una àrea major, depenent de les condicions climàtiques dels dies posteriors a l'episodi de pluges.

### **3.3.5. Relacions amb les característiques del sediment**

Hem volgut comparar els resultats en les diferents mostres estudiades en aquest capítol amb els resultats obtinguts en el sediment al **capítol 1**. Per fer aquesta comparació hem utilitzat les concentracions obtingudes en la fracció fina del sediment en la primera etapa de l'esquema d'extracció seqüencial BCR i la concentració pseudototal. La **figura 3.11** mostra la comparació de tots els resultats obtinguts. Podem apreciar que les concentracions augmenten en totes les mostres en realitzar l'exposició al sediment provinent de la desembocadura de les rambles, principalment per al sediment de Beal. Tot i que les concentracions de metall són diferents per a cada matriu, el perfil de concentracions és similar per a totes, de manera que, tot i obtenir informacions diferents, podem arribar a conclusions similars.

Els resultats de la tècnica DGT i la voltametria de redissolució anòdica són comparables, per bé que les concentracions de metall trobades en aigua de mar sempre són molt inferiors a les que es troben en el sediment o en la biota que s'hi desenvolupa, tal com podem veure en la **figura 3.11**. No obstant això, ja hem vist que les concentracions en l'aigua poden variar segons l'exposició al sediment a la qual estigui sotmesa, és a dir que en episodis de resuspensió del sediment aquestes concentracions augmentaran.



**Figura 3.11.** Comparació dels resultats obtinguts en les diferents mostres estudiades per a Pb, Zn i Cd. A la columna de l'esquerra es mostren els resultats obtinguts en el sediment i els organismes, els resultats dels biofilm i el sediment (concentració pseudototal) es referencien a l'eix principal, mentre que els resultats de les algues i de les concentracions extretes a la primera etapa del BCR es referencien a l'eix secundari. Als gràfics de la columna de la dreta podem observar els resultats en l'aigua.

En el cas de la biota estudiada, generalment les concentracions trobades en el biofilm són majors que les que es troben en l'alga *Ulva lactuca*, probablement a causa de les diferències en les condicions d'exposició. Tanmateix, el comportament davant dels diferents sediments estudiats és el mateix: en general les concentracions de metall acumulades en l'organisme creixen segons el sediment al qual s'han exposat en l'ordre referència > Ponce  $\geq$  Carrasquilla > Beal. En aquesta zona va obtenir resultats similars Marín Guirao [3.37], que estudia l'acumulació de metalls per l'alga *Cymodocea nodosa* que creix a la zona. L'explicació es troba, en part, pel fet que la rambla de Beal és la que presenta un major percentatge de fins en el seu material que fan que tingui un transport més efectiu. A més aquesta rambla va ser utilitzada durant anys per a la descàrrega d'estèrils durant l'explotació minera. El fet que el sediment presenti concentracions similars a les trobades en el biofilm pot ser degut a la deposició de metalls sobre aquest per l'arrossegament en episodis de pluges torrencials, que introdueixen grans quantitats de metalls associats amb fins a través de les rambles. També pot ser degut a la deposició de sediments fins resuspendos a causa de les onades.

### 3.4. CONCLUSIONS

Les principals conclusions que es poden extreure d'aquest estudi són les següents:

1. S'ha avaluat l'ús de biofilm desenvolupat al mar Menor com a biomonitor de la contaminació per metalls al mateix mar. En aquest cas hem vist que el biofilm acumula el metall segons la seva localització geogràfica, amb punts on l'acumulació de metalls és molt més elevada que en altres. També es veu que el fet que el biofilm es desenvolupi en contacte amb el sediment fa que l'acumulació de metalls sigui major que si aquest es desenvolupa en la columna d'aigua. Els resultats obtinguts es poden relacionar amb les característiques físicoquímiques del sediment a partir de la informació proporcionada pels esquemes d'extracció seqüencial.
2. S'ha experimentat amb l'exposició a sediment i a aigua provinent del mar Menor d'algues desenvolupades en punts lliures de contaminació metàl·lica. Aquests experiments s'han realitzat al laboratori i s'han obtingut resultats comparables a l'acumulació de metalls pel biofilm desenvolupat al mar Menor, per bé que en aquest cas les concentracions són inferiors a causa de les diferències en les condicions d'exposició.
3. S'ha determinat la concentració de metalls acumulada per diferents espècies de peixos i escopinyes provinents del mar Menor. Això ha mostrat que les concentracions, tot i no ser tan elevades com en el cas del biofilm, en alguns casos són superiors als nivells desitjats, sobretot en el cas de les escopinyes. Caldria realitzar un estudi més en profunditat per avaluar els riscos potencials en la xarxa tròfica present al mar Menor.
4. Les concentracions en l'aigua del mar Menor s'han determinat mitjançant la tècnica DGT i per voltametria de redissolució anòdica (ASV). Els resultats d'ambdues tècniques són comparables i les concentracions de metall en l'aigua del mar Menor són baixes, tot i les elevades concentracions trobades en sediment i biota. Aquestes concentracions, però, poden augmentar en episodis de resuspensió del sediment.

---

### 3.5. REFERÈNCIES

- 3.1- BERVOETS L et al. (1998) Trace metal levels in Chironomid larvae and sediments from a Bolivian river: impact of mining activities. *Ecotox Environ Safe* 41:275-283
- 3.2- MANAHAN SE (2007) *Introducción a la química ambiental* (1a ed.) Barcelona: Editorial Reverté
- 3.3- KOSTER M et al. (2005) Comparison of the method of diffusive gels in thin films with conventional extraction techniques for evaluating zinc accumulation in plants and isopods. *Environ Pollut* 133:103-116
- 3.4- CAMPANELLA L et al. (2001) Trace metals in seagrass, algae and molluscs from an uncontaminated area in the Mediterranean. *Environ Pollut* 111:117-126
- 3.5- CONTI ME, CECCHETTI G (2003) A biomonitoring study: trace metals in algae and molluscs from Tyrrhenian coastal areas. *Environ Res* 93:99-112
- 3.6- RAINBOW PS (1995) Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Mar Pollut Bull* 31:183-192
- 3.7- BEHRA R et al. (2002) Copper and zinc content of periphyton from two rivers as a function of dissolved metal concentration. *Aquat Sci* 64:300-306
- 3.8- MEYLAN S, BEHRA R, SIGG L (2003) Accumulation of copper and zinc in periphyton in response to dynamic variations of metal speciation in freshwater. *Environ Sci Technol* 37:5204-5212
- 3.9- MEYLAN S, BEHRA R, SIGG L (2004) Influence of Metal Speciation in Natural Freshwater on Bioaccumulation of Copper and Zinc in Periphyton: A Microcosm Study. *Environ Sci Technol* 38:3104-3111
- 3.10- ZHANG H (2004) In-situ speciation of Ni and Zn in freshwaters: comparison between DGT measurements and speciation models. *Environ Sci Technol* 38:1421-1427
- 3.11- ZHANG H, DAVISON W (1995) Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the in situ measurements of trace metals in aqueous solution. *Anal Chem* 67:3391-3400
- 3.12- GIMPEL J et al. (2001) Effect of solution composition, flow and deployment time on the measurement of trace metals by the diffusive gradient in thin films technique. *Anal Chim Acta* 448:93-103
- 3.13- TUSSEAU-VUILLEMIN MH et al. (2004) Performance of diffusion gradient in thin films to evaluate the toxic fraction of copper to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 23:2154-2161

- 3.14- LARNER BL, SEEN AJ, SNAPE I (2006) Evaluation of diffusive gradients in thin film (DGT) samplers for measuring contaminants in the Antarctic marine environment. *Chemosphere* 65:811-820
- 3.15- TWISS MR, MOFFETT JW (2002) Comparison of Copper Speciation in Coastal Marine Waters Measured Using Analytical Voltammetry and Diffusion Gradient in Thin-Film Techniques. *Environ Sci Technol* 36:1061-1068
- 3.16- WEBB JA, KEOUGH MJ (2002) Measurement of environmental trace-metal levels with transplanted mussels and diffusive gradients in thin films (DGT): a comparison of techniques. *Mar Pollut Bull* 44:222-229
- 3.17- ZHANG H et al. (1995) In situ high resolution measurements of fluxes of Ni, Cu, Fe and Mn and concentrations of Zn and Cd in porewaters by DGT. *Geochim Cosmochim Acta* 59:4181-4192
- 3.18- HARPER MP et al. (1998) Kinetics of metal exchange between solids and solutions in sediments and soils interpreted from DGT measured fluxes. *Geochim Cosmochim Acta* 62:2757-2770
- 3.19- ERNSTBERGER H et al. (2002) Measurement and dynamic modeling of trace metal mobilization in soils using DGT and DIFS. *Environ Sci Technol* 36:349-354
- 3.20- ZHANG H et al. (2002) Localised remobilization of metals in a marine sediment. *Sci Total Environ* 296:175-187
- 3.21- ALMAS AR et al. (2006) Speciation of Cd and Zn in contaminated soils assessed by DGT-DIFS, and WHAM/Model VI in relation to uptake by spinach and ryegrass. *Chemosphere* 62:1647-1655
- 3.22- LARNER BL, SEEN AJ (2005) Evaluation of paper-based diffusive gradients in thin film samplers for trace metal sampling. *Anal Chim Acta* 539:349-355
- 3.23- LI W et al. (2002) Application of a cellulose phosphate ion exchange membrane as a binding phase in the diffusive gradients in thin-films technique for measurement of trace metals. *Anal Chim Acta* 464:331-339
- 3.24- LI W et al. (2005) Trace metal speciation measurements in waters by the liquid binding phase DGT device. *Talanta* 67:571-578
- 3.25- LI W et al. (2005) Metal speciation measurement by diffusive gradients in thin films with different binding phases. *Anal Chim Acta* 533:193-202

- 
- 3.26- LI W et al. (2003) Application of a Poly(4-styrenesulfonate) liquid binding layer for measurement of  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Cd}^{2+}$  with the diffusive gradients in thin-films technique. *Anal Chem* 75:2578-2583
- 3.27- NAYLOR C et al. (2006) Potential kinetic availability of metals in sulphidic freshwater sediments. *Sci Total Environ* 357:208-220
- 3.28- NAYLOR C et al. (2004) Simultaneous release of sulfide with Fe, Mn, Ni and Zn in marine harbour sediment measured using a combined metal/sulfide DGT probe. *Sci Total Environ* 328:275-286
- 3.29- MOTELICA-HEINO M et al. (2003) Simultaneous Release of Metals and Sulfide in Lacustrine Sediment. *Environ Sci Technol* 37:4374-4381
- 3.30- HOLDING KL, GILL RA, CARTER J (2003) The relationship between epilithic periphyton (biofilm) bound metals and metals bound to sediments in freshwater systems. *Environ Geochem Health* 25:87-93
- 3.31- TÜRKMEN M, CIMINLI C (2007) Determination of metals in fish and mussel species by inductively coupled plasma-atomic emission spectrometry. *Food Chem* 103:670-675
- 3.32- KOJADINOVIC J et al. (2007) Bioaccumulation of trace elements in pelagic fish from the Western Indian Ocean. *Environ Pollut* 146:548-566
- 3.33- KALAY M, AY Ö, CANLI M (1999) Heavy Metal Concentrations in Fish Tissues from the Northeast Mediterranean Sea. *Bull Environ Contam Toxicol* 63:673-681
- 3.34- DURAL M et al. (2006) Bioaccumulation of some heavy metals in different tissues of *Dicentrarchus labrax* L, 1758, *Sparus aurata* L, 1758 and *Mugil cephalus* L, 1758 from the Çamlık lagoon of the eastern coast of Mediterranean (Turkey). *Environmental Monitoring and Assessment* 118:65-74
- 3.35- DE LEÓN AR, GUERRERO J, FARACO F (1982) *Evolution of the pollution of the coastal lagoon of Mar Menor*. VI Journées Étud Pollutions, Cannes, CIESM
- 3.36- COBELO-GARCÍA A, PREGO R (2004) Chemical speciation of dissolved copper, lead and zinc in a ria coastal system: the role of resuspended sediments. *Anal Chim Acta* 524:109-114
- 3.37- MARÍN GUIRAO L (2007) *Aproximación ecotoxicológica a la contaminación por metales pesados en la laguna costera del Mar Menor* (Tesi Doctoral) Universidad de Murcia







## **CAPÍTOL 4**

**Determinació de compostos  
organoestànics en organismes  
del mar Menor**



## 4.1. INTRODUCCIÓ

Com s'ha comentat a la introducció general, al mar Menor coexisteixen diferents activitats; els treballs exposats anteriorment en aquesta memòria s'han centrat en l'estudi de la contaminació provinent de l'activitat minera. Tanmateix, s'ha considerat interessant avaluar altres tipus de contaminacions antropogèniques. Al Capítol 3 s'han mostrat dades del contingut d'estany i altres metalls en organismes marins provinents del mar Menor. En aquest capítol es presenta l'especiació de l'estany en aquests mateixos organismes.

L'estany és el metall que té el major nombre de compostos organometàl·lics en ús comercial, amb una producció global que va arribar a les 40.000 tones mètriques per any abans que es restringissin els seus usos a causa de les preocupacions sobre la contaminació de l'aigua. Els principals usos industrials dels compostos orgànics d'estany inclouen aplicacions com fungicides, acaricides, desinfectants, pintures antiincrustants, estabilitzants per disminuir els efectes de la calor i la llum en plàstics de PVC, catalitzadors i precursors per a la formació de pel·lícules de SnO<sub>2</sub> en vidre. El clorur de tributilestany i els compostos relacionats tenen propietats bactericides, fungicides i insecticides i tenen una particular importància ambiental a causa del seu ús com a biocides industrials. A més del clorur de tributilestany, altres compostos de tributilestany (TBT, per les seves sigles en anglès) utilitzats com a biocides inclouen l'hidròxid i el naftenat de tributilestany, l'òxid de bis(tributilestany) i el fosfat de tris(tributilestany). El tributilestany es va utilitzar àmpliament en el recobriment del casc dels vaixells per prevenir el desenvolupament d'organismes formadors d'incrustacions. Altres aplicacions inclouen la preservació de la fusta, cuir, paper i tèxtils. Els compostos de tributilestany s'han utilitzat com a fungicides per prevenir la proliferació de fongs en les torres de refredament d'aigua. A més dels compostos organoestànics sintètics, les espècies metilades d'estany poden produir-se biològicament en el medi ambient. [4.1- 4.4].

Òbviament, les múltiples aplicacions dels compostos orgànics d'estany per a una gran varietat d'usos suposen un important potencial de contaminació ambiental. A causa de les seves aplicacions properes o en contacte amb els reservoris d'aigua, els compostos orgànics d'estany són contaminants importants de l'aigua i s'han vinculat amb trastorns endocrins en marisc, ostres i cargols [4.1]. El TBT s'acumula al llarg de la xarxa tròfica, i es troben concentracions elevades de TBT en el fetge de diverses espècies de balenes, dofins i foques. El TBT arriba als humans, principalment, a través de la ingestió d'aliments

i aigua contaminats. En el nostre organisme, tendeix a acumular-se al fetge, ronyons i teixits grassos, a més d'acumular-se també en el pèl i les ungles [4.5].

A causa d'aquesta problemàtica, diversos països, com els Estats Units d'Amèrica, Anglaterra i França, van prohibir als anys vuitanta l'aplicació de tributilestany en els bucs menors de 25 metres de longitud. En resposta a les preocupacions sobre la contaminació de l'aigua, el 2001 l'Organització Marítima Internacional va acordar prohibir les pintures antiincrustacions de compostos orgànics d'estany en totes les naus a partir del 2003 [4.1, 4.6- 4.8].

En vista de la diversitat de compostos organoestànics utilitzats industrialment, és molt important conèixer-ne el seu comportament en el medi ambient. Els compostos derivats del TBT són un subgrup de la família d'organoestànics trialquilats. És interessant el fet que els alquils tendeixen a ser més tòxics que els arils i que els triorganoestànics són més tòxics que els di-, mono- o tetraorganoestànics. En general, la toxicitat dels organoestànics està més influenciada pels substituents alquilics que pels substituents aniònics. Generalment, les espècies trisubstituïdes (butils o fenils) són més tòxiques que les di- i monosubstituïdes i l'anió té poca influència en aquesta toxicitat [4.9, 4.10].

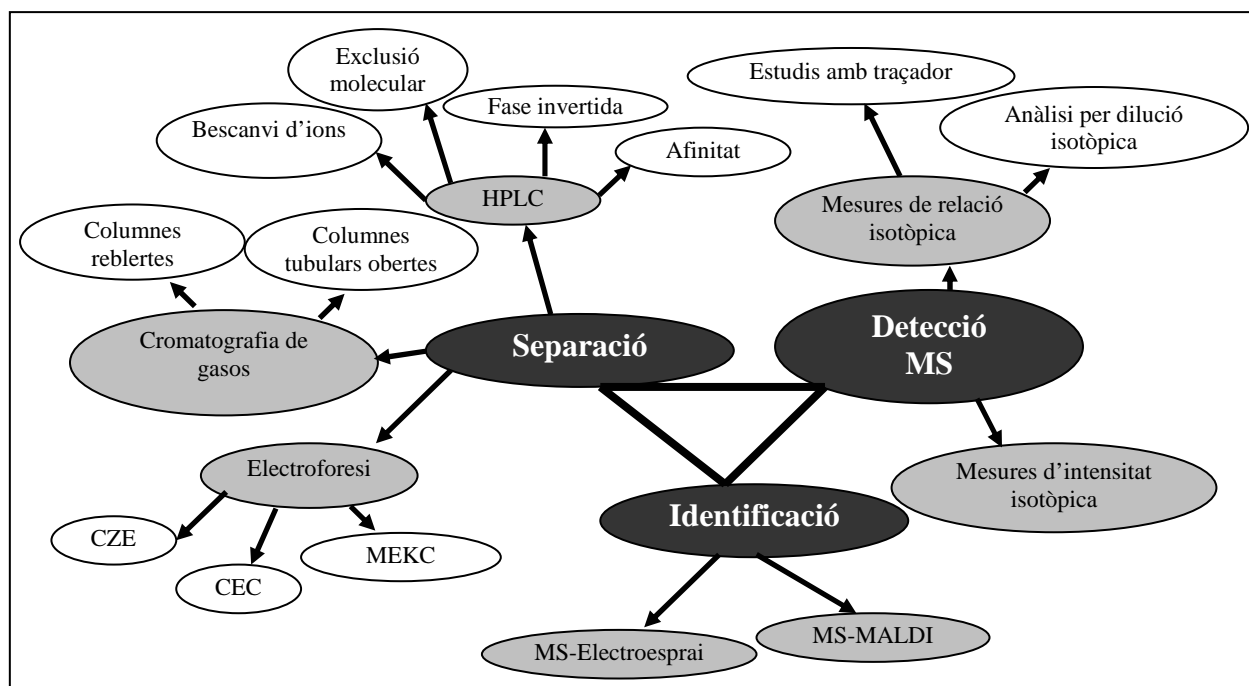
La Unió Europea ha inclòs recentment el TBT en la llista de compostos que s'han de monitoritzar en aigües de manera regular. Per tant, es necessiten mètodes que siguin prou sensibles per a una determinació simultània i precisa dels compostos organoestànics en diferents mostres ambientals. Com que la seva toxicitat depèn de l'espècie present i varia segons l'organisme que queda afectat, l'especiació d'aquests compostos es converteix en un tema important [4.11].

L'especiació es defineix com la identificació i quantificació d'una o més espècies químiques d'un element presents en una mostra. La combinació d'una tècnica de separació cromatogràfica, que ens permet aïllar l'espècie que volem analitzar de les altres en el seu pas per la columna cromatogràfica, amb espectrometria atòmica ha esdevingut l'eina fonamental per a l'especiació. Una tècnica analítica per a l'especiació ha de complir els tres objectius següents:

- Selectivitat de la tècnica de separació, que permeti que l'espècie que es vol analitzar arribi al detector ben separada d'interferències potencials de la matriu i de qualsevol altre tipus.

- Sensibilitat de la tècnica de detecció selectiva a l'anàlit, ja que aquest es trobarà probablement a nivells traça en les mostres ambientals.
- Identificació de les espècies. Normalment s'utilitza el temps de retenció i es requereix la comparació amb patrons.

A la **figura 4.1** es mostra un esquema de les tècniques emprades i la informació que proporcionen. Els mètodes utilitzats normalment impliquen una tècnica de separació: cromatografia de gasos (GC) o líquida (HPLC), acoblada a un mètode de detecció d'estany: espectroscòpia atòmica d'absorció (AAS), espectrometria de masses (MS) o detector fotomètric de flama (FPD) [4.12, 4.13].



**Figura 4.1.** Tècniques analítiques d'especiació.

Dins el sistema acoblat, la part de separació dels components és important, especialment quan les espècies d'interès tenen propietats fisicoquímiques semblants. Sempre que sigui possible és millor escollir la cromatografia de gasos per la gran eficàcia de separació i els baixos límits de detecció als quals podem arribar. Per a espècies no volàtils és necessària una etapa de derivatització prèvia a la separació per cromatografia de gasos o bé podem escollir tècniques com la cromatografia líquida (HPLC) o l'electroforesi capil·lar, que no requereixen que els compostos siguin volàtils. Per a l'anàlisi per cromatografia de gasos, les espècies d'organoestànics s'han d'extreure de la matriu de la

mostra i convertir-se en les seves formes completament alquilades, que són més volàtils i poden ser separades mitjançant aquesta tècnica analítica.

Cal destacar que les etapes crítiques de la determinació d'organoestànics són les inicials de tractament de mostra, és a dir, l'extracció d'aquests compostos de la matriu i la derivatització per a la seva anàlisi posterior [4.14, 4.15]. Les tècniques d'extracció utilitzades més comunament en mostres sòlides són l'extracció tant àcida com amb solvent, l'extracció amb fluid supercrític o l'extracció assistida per microones o bé per ultrasons [4.11]. Aquestes tècniques requereixen temps llargs per al tractament de la mostra i en molts casos s'obtenen baixos percentatges de recuperació. En aquest context, s'està desenvolupant l'aplicació de sondes d'ultrasons directament a la mescla. En realitzar aquesta aplicació es produeix la cavitació acústica, provocada per les bombolles formades per una ona sonora en un líquid que es comprimeix i descomprimeix contínuament. Els resultats són temperatures i pressions extremes generades en el líquid a un micronivell, així com la termòlisi del solut i la formació de radicals hidroxil i peròxid d'hidrogen. Com a conseqüència, quan tenim un sòlid present en un medi aquós, l'anàlit contingut en el sòlid pot ser extret parcialment o totalment en el medi líquid més ràpidament que mitjançant altres mètodes clàssics [4.16-4.18].

Les reaccions de derivatització més utilitzades normalment en la determinació de compostos organoestànics són la generació d'hidrurs amb tetrahidroborat de sodi o l'alquilació, ja sigui amb un reactiu de Grignard, amb tetraetilborat de sodi o amb tetrapropilborat de sodi [4.3, 4.12, 4.14, 4.19-4.22]. En el cas de matrius aquoses, la generació d'hidrurs és fàcilment aplicable i s'aconsegueixen elevats factors de preconcentració, a més de la separació dels anàlits d'interès de les interferències presents en la matriu. Per altra banda, quan treballem amb matrius més complicades s'observen força interferències. A més, la inestabilitat i volatilitat dels hidrurs de butilestany poden comportar pèrdues dels compostos i, per tant, a no avaluar la contaminació existent per complet.

La transformació de les sals organoestàniques en compostos més volàtils s'aconsegueix mitjançant la reacció amb un reactiu de Grignard (RMgX) en un solvent adequat. Aquesta tècnica permet la formació de derivats molt estables. Cal destacar que els reactius de Grignard són agents perillosos que reaccionen violentament amb àcids, aigua, alcohols, cetones, etc. i s'han de manipular amb una cura extrema. La derivatització de Grignard permet la determinació de diferents espècies d'organoestànics en diverses

matrius ambientals, amb elevats percentatges de derivatització i reproductibilitat. Malgrat això, es caracteritza per la necessitat de nombroses etapes, cosa que fa que augmenti el risc de contaminació, descomposició i pèrdues d'anàlit. Així mateix, provoca un increment en el temps d'anàlisi.

Per evitar aquestes dificultats, s'ha desenvolupat un mètode per derivatitzar els organoestànics que es pot aplicar directament sobre la fase aquosa utilitzant tetraetilborat de sodi o tetrapropilborat de sodi, de manera que la derivatització dels compostos organoestànics es pot dur a terme en un sol pas amb la consegüent reducció de les etapes analítiques. A més, la presència d'elements inorgànics no afecta la reacció d'alquilació [4.19, 4.22]. El desavantatge del tetrapropilborat de sodi és la seva inestabilitat i el fet que no es troba disponible comercialment i, per tant, s'ha de sintetitzar en el laboratori [4.23].

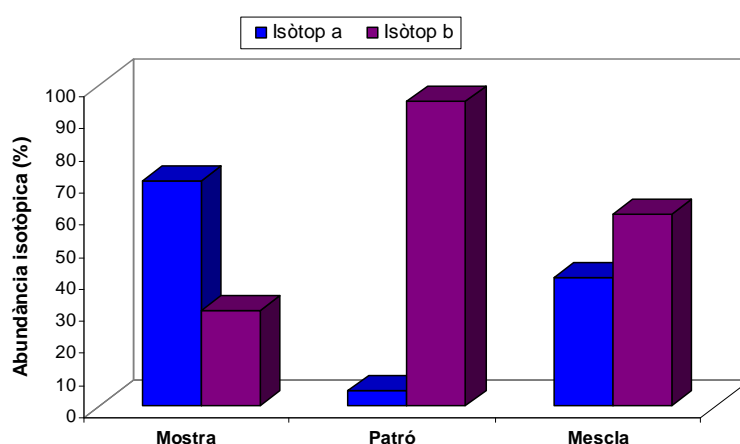
La complexitat de la majoria de mostres ambientals fa necessari assegurar la qualitat del procediment d'especiació per complet, ja que comporta múltiples etapes, començant per l'extracció sòlid-líquid inicial i acabant per la detecció final. Per validar els mètodes i tècniques d'especiació podem recórrer a:

- Mostres fortificades o artificials, però no és possible assegurar que les espècies afegides es comportaran de la mateixa manera que les existents en la matriu de la mostra.
- Comparació dels resultats amb altres que s'hagin obtingut utilitzant un altre procediment d'especiació. Tot i que és una aproximació vàlida, ens resultarà difícil trobar una metodologia d'especiació alternativa.
- Materials de referència certificats (CRM). Ja sabem que els materials de referència amb valors certificats per a les espècies d'interès tenen un paper important, però són escassos i per a espècies i matrius limitades; a més, alguns dels valors certificats poden causar problemes a causa de l'elevada incertesa observada en els resultats dels exercicis d'intercomparació (entre laboratoris diferents).
- Ús de procediments de referència altament qualificats, com la dilució isotòpica amb espectrometria de masses (ID-MS). En les condicions d'operació apropiades, l'ID-MS (s'afegeix un traçador amb l'espècie d'interès enriquit en un isòtop del metall) es pot considerar com un mètode de mesura "primari" (té les propietats metrologicals elevades; sovint s'escull amb finalitats certificatives). A causa de l'elevada exactitud i



precisió que presenta, es pot implementar per corregir la majoria d'errors associats a les etapes d'especiació [4.7, 4.24]

L'anàlisi per dilució isotòpica es basa en l'alteració de les abundàncies isotòpiques d'un element present en la mostra mitjançant l'addició d'una quantitat coneguda de patró del mateix element enriquit isotòpicament. L'element que volem determinar ha de tenir, com a mínim, dos isòtops estables o radioactius de vida llarga perquè puguin ser analitzats en un espectròmetre de masses. Podem veure un exemple d'aquest principi a la **figura 4.2** per a un element que presenta dos isòtops diferents, *a* i *b*. Com podem observar, l'isòtop *a* és el més abundant a la mostra, mentre que el patró que afegim està enriquit en l'isòtop *b*.



**Figura 4.2.** En aquesta figura podem veure els principis de l'anàlisi per dilució isotòpica d'un element que presenta dos isòtops (*a* i *b*).

D'aquesta manera, l'abundància dels dos isòtops *i*, per tant, la relació isotòpica de la mescla serà intermèdia entre la que hi havia a la mostra i la del patró enriquit i dependrà tant de les quantitats de patró afegides com de la quantitat inicial de l'element present a la mostra.

Aquestes relacions es poden expressar matemàticament utilitzant l'**equació 4.1**:

$$c_s = c_{sp} \frac{m_{sp}}{m_s} \frac{M_s}{M_{sp}} \frac{A_{sp}^{119}}{A_s^{120}} \left( \frac{R_m - R_{sp}}{1 - R_m \cdot R_s} \right) \quad (\text{Eq. 4.1})$$

En aquesta equació, la concentració de l'element a la mostra ( $c_s$ ) es determina mesurant únicament la  $R_m$ , ja que tots els altres paràmetres són coneguts:

- $c_s$  i  $c_{sp}$  són les concentracions de l'element a la mostra i en el patró de butilats d'estany enriquit en  $^{119}\text{Sn}$  (traçador), respectivament.

- $m_S$  i  $m_{Sp}$  són les masses de mostra i traçador que tenim en la mescla, respectivament.
- $M_S$  i  $M_{Sp}$  són els pesos atòmics de l'element a la mostra i al traçador, respectivament.
- $A_{Sp}^{119}$  i  $A_S^{120}$  són les abundàncies isotòpiques de l'isòtop de referència a la mostra i al traçador, respectivament.
- $R_m$  i  $R_{Sp}$  són les relacions isotòpiques (120/119) en la mescla i en el traçador, respectivament.
- $R_S$  és la relació isotòpica (119/120) a la mostra.

Com podem observar, l'equació no conté cap factor relacionat amb la sensibilitat instrumental, cosa que la fa immune a canvis de sensibilitat deguts a deriva instrumental o efectes matriu.

Per altra banda, una vegada establert l'equilibri isotòpic en la mescla de mostra i traçador, qualsevol alíquota d'aquesta tindrà la mateixa relació  $R_m$  i, per tant, no és necessari conèixer els factors de dilució o preconcentració realitzats i qualsevol procés de separació no quantitatiu no tindrà influència en el resultat final [4.25- 4.27].

Podem aplicar aquesta tècnica tant amb cromatografia líquida i de gasos acoblades a ICP-MS [4.7, 4.24] com a GC-MS [4.28]. Els avantatges de l'ús de cromatografia de gasos acoblada a ICP-MS són que els espectres de masses són més simples, té menys interferències espectrals i més sensibilitat i, a més, la mesura de les relacions isotòpiques és més simple, ja que no cal tenir en compte la composició isotòpica en C i H de l'ió molecular. Per altra banda, no tots els laboratoris disposen d'aquesta instrumentació, que és cara i presenta certes dificultats per al seu acoblament (existeixen poques interfícies comercials), de manera que l'ús de GC-MS es converteix en una tècnica més fàcilment aplicable de manera rutinària en qualsevol laboratori. Quan es tracta de centenars de mostres, el GC-MS és realment la tècnica més econòmica establerta en els laboratoris ambientals [4.3, 4.13, 4.28- 4.30].

L'objectiu d'aquest estudi és aconseguir un mètode fàcil i ràpid per a la determinació simultània de tributilestany i els seus metabòlits, monobutilestany i dibutilestany, en organismes marins, combinant l'extracció mitjançant l'aplicació d'una sonda d'ultrasons, la derivatització amb tetraetilborat de sodi i l'anàlisi per dilució isotòpica GC-MS. Aquesta metodologia s'aplicarà a mostres de peixos i bivalves provinents del mar Menor per avaluar la contaminació per espècies organoestàniques.

## 4.2. EXPERIMENTAL

### 4.2.1. Equips i reactius

L'anàlisi cromatogràfica es realitza amb un cromatògraf de gasos 6890N (Agilent Technologies), equipat amb una columna cromatogràfica HP-5MS de 30 m de longitud, 0,25 i. d. i 0,25 µm de gruix de fase estacionària. Com a sistema de detecció s'utilitza un espectròmetre de masses quadripolar 5973 Network MSD. El sistema consta d'injector automàtic (model 7683).

Per a l'anàlisi de mostra s'utilitza una sonda d'ultrasons, model Sonopuls HD 2200 (Bandelin, Alemanya), equipada amb un convertidor ultrasònic UW2200, ressonador estàndard SH 213 G i micropunta de titani MS73 (3 mm).

Tots els reactius utilitzats són de qualitat per a anàlisi o superior. Els butilats d'estany (MBT, DBT i TBT) provenen d'Aldrich (Alemanya). Es preparen dissolucions estoc de concentració aproximada 1.000 mg L<sup>-1</sup> dels butilats d'estany en metanol (Teknokroma); aquestes dissolucions són estables durant mesos. A partir d'aquests estocs es prepara una dissolució intermèdia de concentració aproximada 10 mg L<sup>-1</sup>, que és estable aproximadament durant una setmana. Els patrons i solucions de fortificació de les mostres es preparen per dilució de la solució intermèdia amb metanol diàriament i es conserven a la foscor a 4 °C.

Es prepara una dissolució de tetraetilborat de sodi (NaBEt<sub>4</sub>, STREM Chemicals) a l'1 % en pes en aigua milli-Q (Millipore) diàriament.

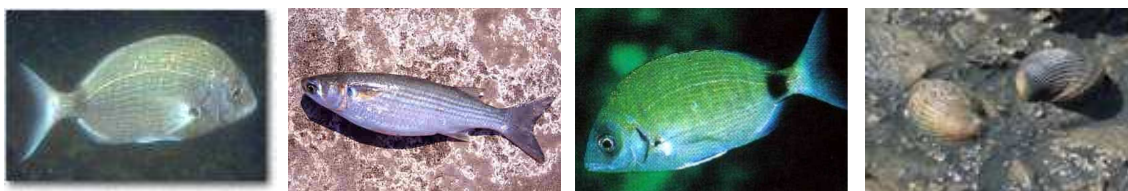
La dissolució tampó de pH 5,0 es prepara dissolent 13,6 g d'acetat de sodi (Panreac) en 1 litre d'aigua milli-Q. El pH s'ajusta amb àcid acètic glacial (Merck).

S'han utilitzat dos materials de referència certificats de característiques diferents: per una banda teixit de peix, NIES-11 (National Institute for Environmental Studies, Japó), i per l'altra teixit de músculo, CRM477 (originalment comercialitzat amb el nom de BCR-477, provinent de l'Institute for Reference Materials and Measurements), per avaluar l'exactitud i precisió del mètode. Per a l'anàlisi per dilució isotòpica es requereix l'ús d'un patró de butilats d'estany enriquit en <sup>119</sup>Sn (ISC-Science, Espanya).

## 4.2.2. Procediment experimental

### 4.2.2.1. Presa de mostres

Les mostres estudiades en aquest treball provenen del mar Menor. Es van recollir tres espècies diferents de peixos (*Diplodus anularis*, *Mugil cephalus* i *Diplodus sargus*) i algunes escopinyes (*Cerastoderma edule glaucum*) per realitzar la determinació d'organoestànics (figura 4.3). També es van obtenir musclos al mercat (*Mytilus galloprovincialis*) per realitzar estudis de recuperació amb mostres fortificades.



**Figura 4.3.** Imatge dels organismes marins que hem estudiat, de dreta a esquerra: *Diplodus anularis*, *Mugil cephalus*, *Diplodus sargus* i *Cerastoderma edule glaucum*.

Les mostres es van portar congelades. Un cop al laboratori, es va extreure el teixit tou dels mol·luscs i el múscul dels peixos i es van liofilitzar. Les mostres liofilitzades es trituren per homogeneïtzar-les i es conserven a -20 °C fins a la seva anàlisi.

### 4.2.2.2. Derivatització dels compostos organoestànics

En primer lloc s'ha estudiat la derivatització dels compostos per poder-los analitzar per cromatografia de gasos, ja que, com s'ha comentat anteriorment, proporciona millor sensibilitat i selectivitat. Tradicionalment, aquesta derivatització s'havia realitzat mitjançant reacció de Grignard, però suposa un procés llarg que comporta moltes etapes i, consegüentment, més possibilitats de contaminació, i això ha portat a l'estudi d'altres agents derivatitzants, com borhidrur o tetraetilborat de sodi. En el nostre cas, s'ha optat per la derivatització amb tetraetilborat de sodi com a mètode amb provada eficàcia. D'aquesta manera la derivatització es torna un procés fàcil i ràpid, la qual cosa permet la derivatització i posterior extracció de les espècies derivatitzades en una mateixa etapa amb uns percentatges de derivatització similars als obtinguts mitjançant l'alquilació per reacció de Grignard [4.3, 4.28, 4.31].

La derivatització amb tetraetilborat de sodi es realitza addicionant-lo a la mostra ajustada a pH 5 mitjançant la dissolució tampó; s'afegeixen 500 µL de la dissolució de

tetraetilborat de sodi en aigua a l'1 %. També s'afegeix 1 mL d'hexà, de manera que els compostos derivatitzats són extrets a la fase orgànica per a l'anàlisi posterior.

#### 4.2.2.3. Condicions cromatogràfiques

Els compostos organoestànics estudiats s'han determinat mitjançant cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses. Les condicions utilitzades en la programació de temperatura són les següents: temperatura inicial de 50 °C, que es manté 1 minut, increment fins a 250 °C a una velocitat de 30 °C min<sup>-1</sup>. S'utilitza heli com a gas portador a un flux d'1,2 ml min<sup>-1</sup>. S'injecta 1 µL sense derivació i es manté l'injector a 260 °C. La temperatura de la interfície es manté a 280 °C. El temps d'integració fixat és de 10 ms per massa.

#### 4.2.2.4. Anàlisi per dilució isotòpica mitjançant GC-MS

En l'anàlisi per dilució isotòpica mitjançant cromatografia de gasos acoblada a espectrometria de masses (GC-MS), els espectres de masses es compliquen a causa de les contribucions de <sup>13</sup>C als diferents ions. Centineo et al. [4.28] proposen les següents equacions per corregir aquestes contribucions a la intensitat de cada ió (I):

$$\begin{aligned} {}^{116}\text{Sn} &= I \\ {}^{117}\text{Sn} &= I - x({}^{116}\text{Sn}) \\ {}^{118}\text{Sn} &= I - x({}^{117}\text{Sn}) - y({}^{116}\text{Sn}) \\ {}^{119}\text{Sn} &= I - x({}^{118}\text{Sn}) - y({}^{117}\text{Sn}) \\ {}^{120}\text{Sn} &= I - x({}^{119}\text{Sn}) - y({}^{118}\text{Sn}) \end{aligned}$$

On  $x$  és el factor de contribució de l'ió  $[M+1]^+$  i  $y$  és el factor de contribució de  $[M+2]^+$ . Aquests es calculen a partir de l'abundància natural del <sup>13</sup>C [4.28]. Les contribucions dels ions <sup>114</sup>Sn i <sup>115</sup>Sn són negligibles perquè la seva abundància natural és molt baixa; per tant, la intensitat mesurada per a l'ió <sup>116</sup>Sn es pot considerar lliure de les contribucions de  $[M+1]^+$  i  $[M+2]^+$ . Les masses escollides per a la mesura de MBT, DBT i TBT per GC-MS i els factors de contribució  $x$  i  $y$  es donen a la **taula 4.1**. Les relacions isotòpiques es computen com la relació entre les àrees de pic un cop tingudes en compte les contribucions  $[M+1]^+$  i  $[M+2]^+$  per a cada ió. Per calcular la concentració es pot utilitzar tant la relació <sup>120</sup>Sn/<sup>119</sup>Sn com <sup>118</sup>Sn/<sup>119</sup>Sn en l'**equació 4.1** i s'obtenen els mateixos resultats [4.25].

**Taula 4.1.** Masses dels ions seleccionats per ser monitoritzats i factors de contribució per a MBT, DBT i TBT per al fragment M-29, que correspon a la pèrdua d'un grup etil.

Isòtop Sn corresponent	MBT (BuEt <sub>2</sub> Sn <sup>+</sup> )	DBT (Bu <sub>2</sub> EtSn <sup>+</sup> )	TBT (Bu <sub>3</sub> Sn <sup>+</sup> )
116	231	259	287
117	232	260	288
118	233	261	289
119	234	262	290
120	235	263	291
x [M+1] <sup>+</sup>	0,088	0,110	0,132
y [M+2] <sup>+</sup>	0,0038	0,0060	0,0086

#### 4.2.2.5. Extracció dels compostos organoestànics de mostres i materials de referència

S'utilitza una sonda d'ultrasons amb una amplitud del 40 % (és el valor màxim recomanat pel fabricant) i es treballa a diferents temps per veure els possibles efectes del temps d'aplicació en les recuperacions obtingudes sobre una mostra de referència, en el nostre cas CRM477.

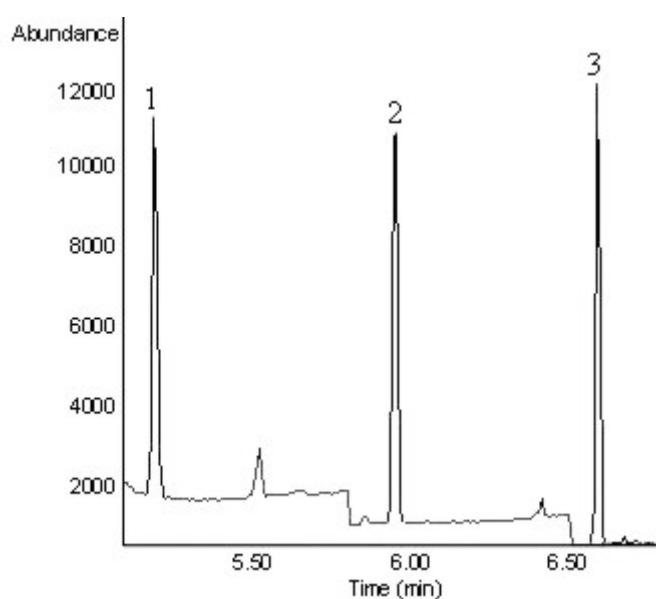
S'agafen 0,2 g de mostra liofilitzada i es fortifiquen amb la barreja de butilats d'estany enriquits en <sup>119</sup>Sn. S'afegeixen 4 mL de barreja àcid acètic-metanol (3:1). Aquesta mescla se sotmet a la sonda d'ultrasons durant el temps fixat; s'han estudiat temps des de 0,5 fins a 4 minuts en intervals de 30 segons. La mescla obtinguda se centrifuga a 4.000 rpm durant 10 minuts i es pren 1 mL de sobrenedant, que es derivatitza segons s'ha descrit en l'**apartat 4.2.2.2**. Per evitar la contaminació de les mostres, la sonda es neteja amb metanol entre mostra i mostra.

Un cop decidit el temps d'aplicació de la sonda d'ultrasons, s'aplica als dos materials de referència certificats i a mostres de músculo fortificades a diferents nivells en les tres espècies d'interès, per avaluar les recuperacions obtingudes. Les mostres es fortifiquen amb una dissolució que conté les tres espècies que es vol estudiar a diferents nivells de concentració (70-190 µg Sn kg<sup>-1</sup>), s'homogeneïtzen i es deixen durant la nit abans de començar el procediment d'extracció descrit anteriorment.

## 4.3. RESULTATS I DISCUSSIÓ

### 4.3.1. Determinació dels compostos organoestànics

La **figura 4.4** mostra el cromatograma obtingut en l'anàlisi del material de referència CRM477 emprant el mètode descrit en l'apartat 4.2.2.3. Com es pot observar, s'obté una bona separació cromatogràfica per als anàlits amb temps de retenció de 5,18, 5,94 i 6,58 minuts per a MBT, DBT i TBT, respectivament.



**Figura 4.4.** Cromatograma obtingut en l'anàlisi de CRM477. Els pics identificats corresponen a MBT (1), DBT (2) i TBT (3).

Per fer l'anàlisi per dilució isotòpica s'ha d'afegir una quantitat de patró de butilats d'estany enriquit en  $^{119}\text{Sn}$  (traçador) a la mostra per aconseguir que la concentració sigui similar a la de la mostra [4.32]. Per establir l'interval de treball per a les mostres, s'analitzen patrons de diferent concentració (3-170  $\mu\text{g Sn L}^{-1}$  per a MBT i 4-250  $\mu\text{g Sn L}^{-1}$  per DBT i TBT) addicionant 100  $\mu\text{L}$  de traçador abans de derivatitzar. En la **figura 4.5** es pot veure que la concentració experimental obtinguda presenta una bona correlació amb la concentració teòrica dels patrons i, per tant, podem establir l'interval de treball on podem utilitzar aquest volum de traçador. Per a mostres amb una major concentració dels anàlits, s'haurà d'addicionar un volum de traçador major per tenir una relació isotòpica adequada.

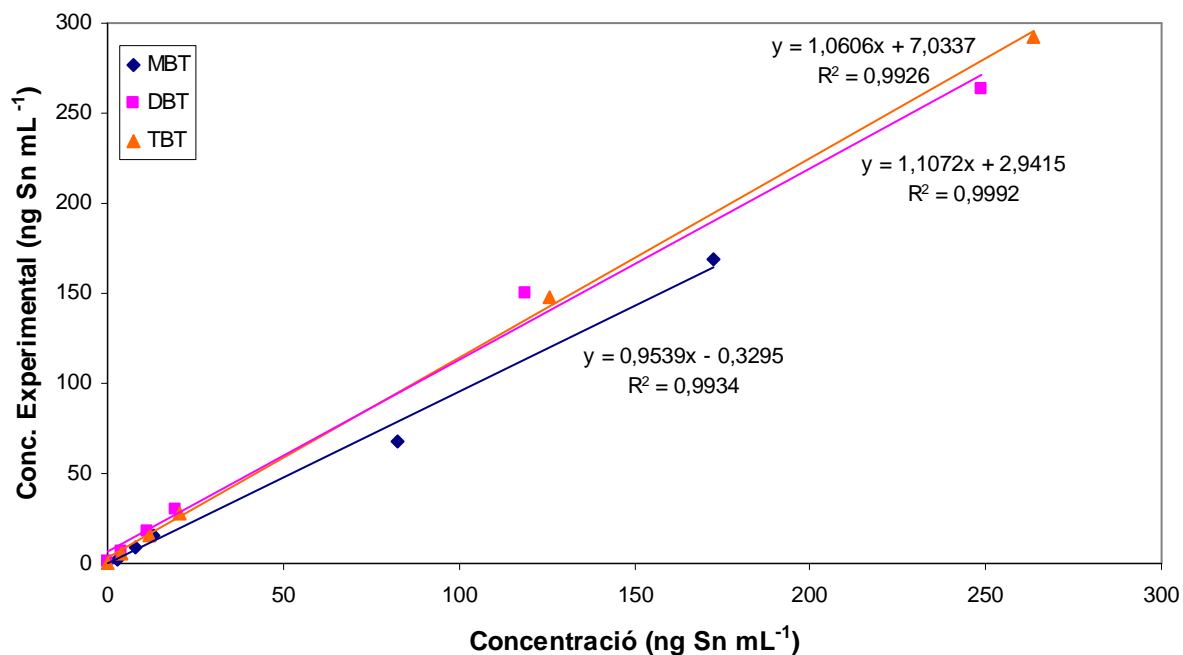
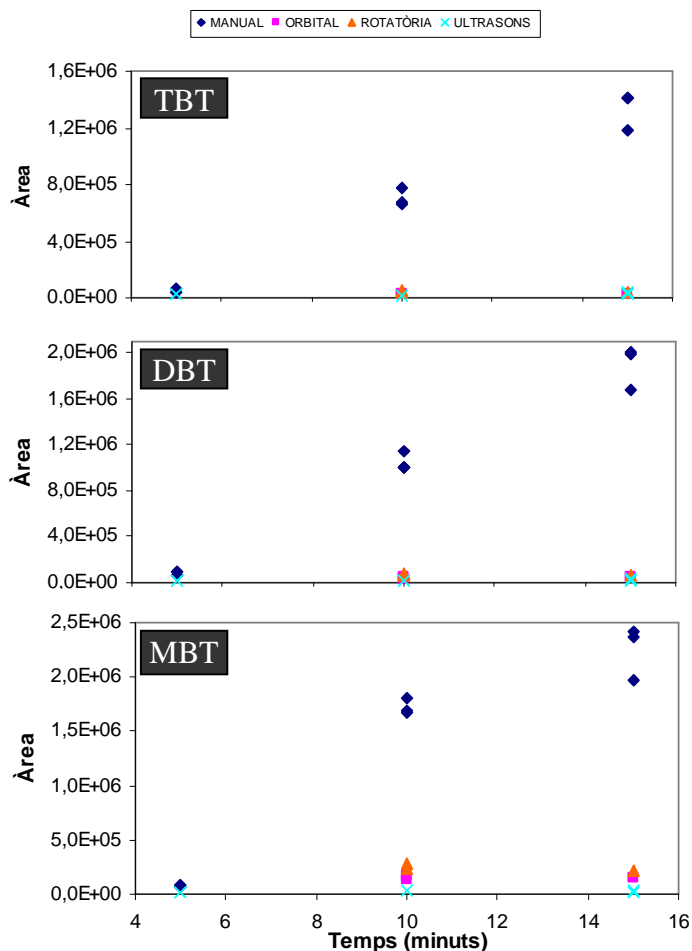


Figura 4.5. Correlació entre la concentració mesurada per dilució isotòpica i la teòrica en patrons.

### 4.3.2. Derivatització dels compostos organoestànics

Malgrat que a la majoria de publicacions es recomana l'agitació manual durant 10 minuts en l'etapa de derivatització, es van assajar diferents tipus d'agitació (manual, orbital, rotatòria i ultrasons) durant diferents temps (5, 10 i 15 minuts). Com podem veure als gràfics de la **figura 4.6**, els millors resultats s'obtenen utilitzant agitació manual i temps d'agitació més llargs,. S'opta per l'agitació manual durant un temps de 10 minuts per no allargar excessivament el temps de tractament de mostra. Aquest temps d'agitació permet obtenir, a més, una millor reproductibilitat.

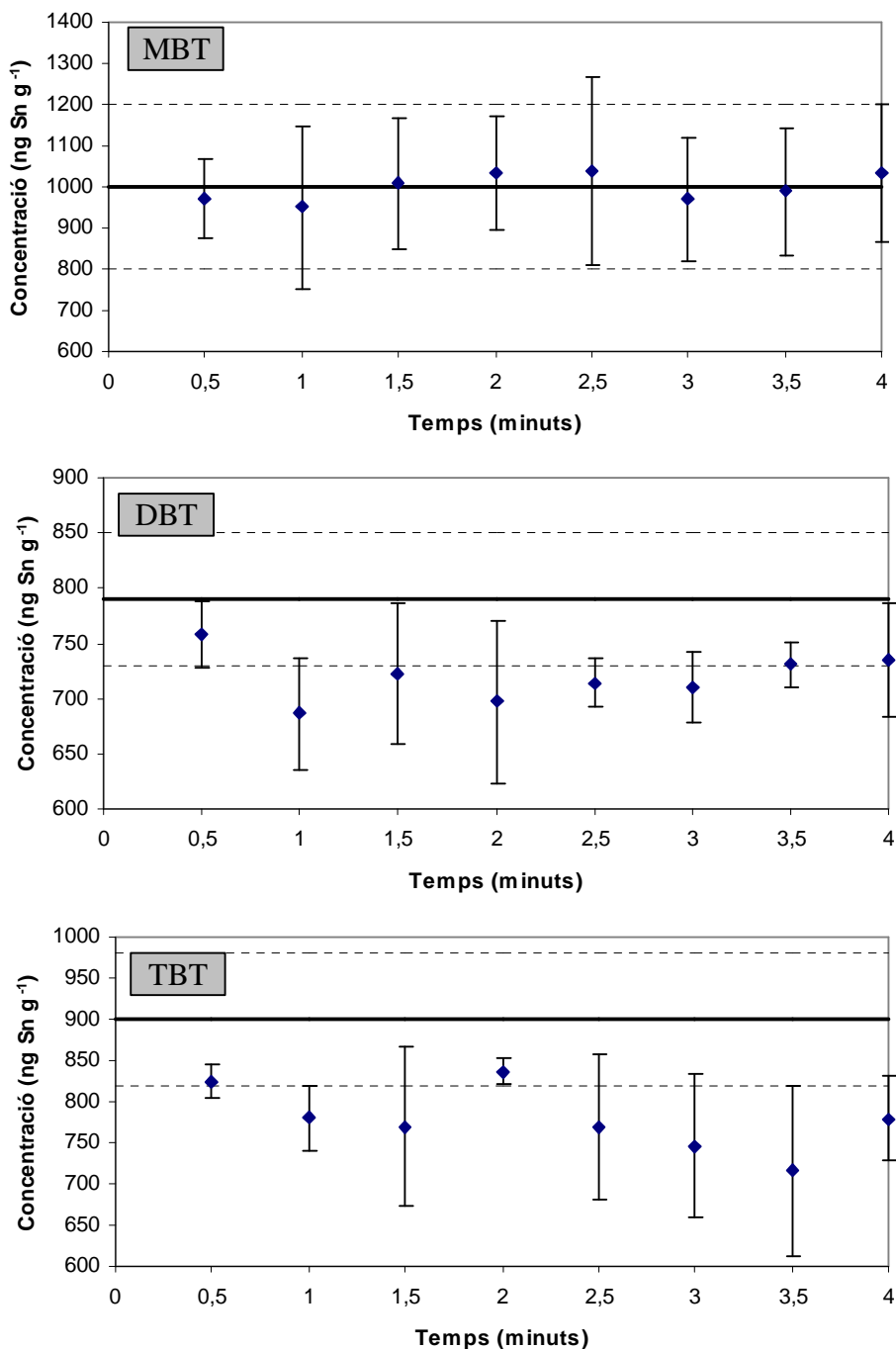




**Figura 4.6.** Resultats obtinguts en els diferents modes d'agitació durant l'etapa de derivatització per als tres compostos estudiats.

### 4.3.3. Optimització de l'etapa d'extracció per a organismes marins

L'etapa d'extracció s'ha optimitzat utilitzant el material de referència CRM477, amb concentracions certificades de MBT, DBT i TBT. Per avaluar el temps necessari per aconseguir una extracció quantitativa, s'ha variat el temps d'aplicació de la sonda d'ultrasons entre 0,5 i 4 minuts en intervals de 30 segons. En la **figura 4.7** es poden veure els resultats d'aquests experiments per a les tres espècies estudiades, juntament amb els valors certificats i els corresponents intervals de confiança.



**Figura 4.7.** Efecte del temps d'aplicació de la sonda d'ultrasons. Resultats obtinguts utilitzant el material de referència CRM477.

L'aplicació d'ultrasons és, normalment, més ràpida i pot comportar majors eficiències d'extracció (particularment per MBT), comparat amb les tècniques d'extracció clàssiques. Malgrat això, la informació obtinguda relativa a l'especiació es pot veure alterada a causa de reaccions de degradació de les nostres espècies causades per les agressives condicions d'extracció. En el nostre cas, com es pot observar a la **figura 4.7**, el

fet d'augmentar el temps d'aplicació no implica una millora en les recuperacions de cap dels tres anàlits. Per tant, s'escull 30 segons com a temps d'extracció òptim per no allargar innecessàriament el temps d'anàlisi. En aquest temps també obtenim els millors resultats quant a precisió i reproductibilitat per a les tres espècies. Cal remarcar que aquest temps és molt inferior a l'emprat en altres metodologies, com la lixiviació àcida per agitació mecànica i/o manual amb un medi polar [4.7, 4.33, 4.34]. Aquests procediments d'extracció requereixen temps que varien de minuts a hores, cosa que contrasta amb l'ús d'una sonda d'ultrasons, on només són necessaris 30 segons. També hem simplificat el tractament de la mostra, ja que únicament es requereix la immersió de la sonda directament.

#### 4.3.4. Avaluació del mètode

Per avaluar la precisió i exactitud dels resultats obtinguts amb el mètode que es proposa, s'analitzen dos materials de referència: el CRM477, teixit de músculo (*M. galloprovincialis*) amb valors certificats per a les tres espècies objecte d'estudi, i el NIES-11, teixit muscular de peix amb valor certificat per TBT. La **taula 4.2** recull els resultats obtinguts amb els límits de confiança del 95 % comparats amb els valors certificats. Els valors experimentals s'han obtingut fent la mitjana de quatre replicats, cadascun injectat per triplicat en el GC-MS.

**Taula 4.2.** Resultats de l'anàlisi dels materials de referència CRM477 i NIES-11. Les concentracions s'expressen com a  $\text{ng Sn g}^{-1}$  i són la mitjana de quatre replicats, cadascun injectat tres vegades.

	TBT		DBT		MBT	
	Valor certificat	Valor experimental	Valor certificat	Valor experimental	Valor certificat	Valor experimental
CRM477	900 ± 80	830 ± 50	790 ± 60	740 ± 20	1.000 ± 200	890 ± 70
NIES-11	470 ± 40	450 ± 10	-	35 ± 3	-	11 ± 3

Les concentracions determinades per a les tres espècies objecte d'estudi en el material de referència CRM477 es troben dins els límits certificats. La precisió del mètode complet es demostra amb valors de RSD (repetitivitat,  $n = 4$ ) acceptables per a totes les espècies: 9,7 %, 4,5 % i 9,9 % per a TBT, DBT i MBT, respectivament. Els resultats corresponents al TBT per a NIES-11 mostren una gran correspondència entre els valors trobats i els certificats amb una elevada precisió, amb valors de RSD ( $n = 4$ ) del 4,7 %.

A més de treballar amb materials de referència certificats, s'ha volgut avaluar el mètode mitjançant estudis de recuperació. Aquests s'han dut a terme fortificant teixit de

musclo amb les tres espècies d'organoestànics a dos nivells (100 i 200  $\mu\text{g Sn kg}^{-1}$ ). Els resultats obtinguts es mostren a la **taula 4.3**. Com es pot observar, les recuperacions es troben en l'interval 89-100 %, 79-88 % i 92-94 % en el cas de MBT, DBT i TBT, respectivament.

**Taula 4.3.** Recuperacions obtingudes per mostres de múscols fortificades a diferents nivells. Les concentracions s'expressen com a  $\text{ng Sn g}^{-1}$  i són la mitjana de quatre replicats, cadascun injectat tres vegades.

Concentració	Recuperació (%)		
	TBT	DBT	MBT
100	93,8 $\pm$ 0,4	88 $\pm$ 6	100 $\pm$ 16
200	92 $\pm$ 5	79 $\pm$ 2	89 $\pm$ 9

#### 4.3.5. Anàlisi de mostres de peixos i bivalves

L'extracció en mostres biològiques sovint provoca l'aparició d'escumes i interfícies col·loïdals entre les fases aquosa i orgànica. Aquestes afecten les recuperacions del mètode i poden ocasionar subestimacions de la concentració de l'anàlit i baixa reproductibilitat. Hem vist, però, que quan s'addiciona el patró en medi metanol per fortificar el teixit de músculo, la formació d'aquesta tercera fase desapareix, de manera que es decideix addicionar 200  $\mu\text{L}$  de metanol a la mostra abans de realitzar l'extracció, resultant amb una excel·lent separació de fases per a les mostres de mol·luscs. Per a les mostres de peixos, amb un major contingut en greix, caldrà centrifugar per poder obtenir una bona separació de les dues fases.

Els resultats de l'anàlisi de les mostres es mostren a la **taula 4.4**. Com es pot veure, les tres espècies estudiades s'han detectat en totes les mostres, i s'observa que per a totes les mostres la concentració augmenta per a les espècies seguint l'ordre TBT > DBT > MBT. A més, la mitjana de les relacions entre la concentració de TBT i de MBT es troba al voltant de 0,5, cosa que indica que el TBT encara és introduït en el medi marí.

**Taula 4.4.** Concentracions obtingudes en les mostres provinents del mar Menor (mitjana de tres replicats, cadascun injectat tres cops en el GC-MS,  $\pm$  la desviació estàndard). Les concentracions s'expressen com ng Sn g<sup>-1</sup>.

	TBT	DBT	MBT
<i>D. anularis</i>	8,4 $\pm$ 0,9	4,7 $\pm$ 0,6	3,9 $\pm$ 0,5
<i>D. sargus</i>	7,3 $\pm$ 0,5	5,7 $\pm$ 0,7	3,5 $\pm$ 0,5
<i>M. cephalus</i>	12 $\pm$ 1	5,5 $\pm$ 0,9	4,3 $\pm$ 0,5
<i>C. edule</i>	1.000 $\pm$ 80	550 $\pm$ 30	540 $\pm$ 50

Pel que fa al contingut de butilats d'estany en les diferents mostres, cal ressaltar que les concentracions de butilats d'estany en peixos són molt inferiors a les trobades en les escopinyes. Aquestes concentracions s'han comparat amb altres estudis realitzats en diferents llocs arreu del món i s'observa que les concentracions trobades en aquest estudi són comparables a les reportades en altres estudis consultats, com es pot veure a la **taula 4.5**. El TBT és present en la majoria de mostres a concentracions majors que la resta d'espècies, de manera que els resultats obtinguts en aquest estudi estan d'acord amb les dades bibliogràfiques.

Estudiant els valors de la **taula 4.5**, observem importants variacions en les concentracions dels anàlits en les diferents regions estudiades. En general, les concentracions en peixos (amb una mitjana de 49 ng Sn g<sup>-1</sup>, en el cas del TBT) són menors que en els mol·luscs (570 ng Sn g<sup>-1</sup>, en el cas del TBT). No obstant això, algunes àrees presenten marcades concentracions de TBT, com ara Alemanya [4.35] i EUA [4.36, 4.37] amb els valors més elevats d'aquesta espècie en peixos (sobre 200 i 300 ng Sn g<sup>-1</sup>). En altres zones, com Corea (musclos i ostres) [4.38, 4.39] i Espanya (musclos i escopinyes) [4.40], es troben elevades concentracions de TBT en mol·luscs (1.200-1.800 ng Sn g<sup>-1</sup>). Els resultats obtinguts en escopinyes en aquest estudi (mostres provinents de la costa est d'Espanya) són similars als resultats obtinguts en un estudi realitzat catorze anys abans en mostres provinents del sud-oest d'Espanya, cosa que denota la presència de fonts de TBT similars en ambdues costes d'Espanya i la permanència dels organoestànics durant més d'una dècada. No obstant això, caldria fer un estudi ambiental més exhaustiu per poder extreure unes conclusions més fonamentades.

**Taula 4.5.** Interval de concentració en mostres provinents de diferents regions del món. Les concentracions s'han convertit totes per expressar-les com a ng Sn g<sup>-1</sup>.

Situació (any)	Espècie	MBT	DBT	TBT	Ref.
EUA (1981-1984)	peixos	-*	-*	102-328	[4.36]
Índia (1989)	peixos	<2,4-3,3	<0,14-0,25	<0,05-0,6	[4.41]
Oceania (1990)	peixos	<2,4-3,4	<0,14-0,38	<0,05-0,14	[4.41]
Vietnam (1990)	peixos	<2,4	<0,14-0,30	<0,05-1,3	[4.41]
Taiwan (1990)	peixos	<2,4-5,5	0,14	0,8	[4.41]
Austràlia (1990-1992)	peixos	<2,4-17,7	<0,14-1,2	<0,05-4,7	[4.41]
EUA (1992-1994)	peixos	-*	-*	<0,7-47	[4.37]
Alemanya (1993)	peixos	13-60	12-28	27-202	[4.35]
Bangla Desh (1994)	peixos	<2,4-71	<0,14-6	0,17-1	[4.41]
Tailàndia (1994)	peixos	<2,4	0,6-1,0	0,5-4,7	[4.41]
Japó (1994-1995)	peixos	<9-28	0,7-23	1,5-77	[4.42]
Japó (1995-1996)	peixos	-*	-*	3,6-7,3	[4.43]
Japó (1996)	peixos	10,5-35	0,8-7	7,3-66	[4.44]
Taiwan (1997)	peixos	<3,4-4,0	7,2-18,2	nd**	[4.45]
Malàisia (1998)	peixos	1-3	0,5-5	0,9-69	[4.46]
Indonèsia (1998)	peixos	0,39-5,9	0,6-7	0,5-19	[4.47]
Espanya (present estudi)	peixos	3,9-4,3	4,7-5,7	7,3-19	
Malàisia (1991)	musclos	-*	-*	5,2-8,6	[4.48]
Alemanya (1993)	musclos	9,5-25	8,7-23	10,3-22	[4.35]
Corea (1994)	musclos	-*	-*	120-1.210	[4.39]
Japó (1994-1995)	musclos	3,95	13,29	16,41	[4.42]
Japó (1995-1996)	musclos	-*	-*	8,4-401,2	[4.43]
Corea (1997-1999)	musclos	3,5-134,6	6,6-429,8	6,2-437,6	[4.38]
Polònia (1998)	musclos	<1,2-4,7	0,5-24	2,2-38,9	[4.32]
Espanya (1993-1994)	musclos	12-160	14-390	71-860	[4.40]
Malàisia (1991)	escopinyes	-*	-*	<0,2-2	[4.48]
Espanya (1993-1994)	escopinyes	20-140	30-280	34-1.200	[4.40]
Espanya (present estudi)	escopinyes	540	550	1.000	
Corea (1994)	ostres	-*	-*	100-1.800	[4.39]
Taiwan (1996-1997)	ostres	<3,4-30,7	5,9-47,7	15,3-550,7	[4.45]

\* No hi ha dades disponibles. \*\* Per sota del límit de detecció.

## 4.4. CONCLUSIONS

Les conclusions principals d'aquest estudi són:

1. S'ha aconseguit desenvolupar un mètode simple, ràpid i robust per a la determinació simultània de MBT, DBT i TBT en mostres ambientals. La combinació de la derivatització amb tetraetilborat de sodi i l'ús d'una sonda d'ultrasons han reduït el temps d'anàlisi d'hores a minuts, i han simplificat també el tractament de la mostra.
2. L'anàlisi mitjançant dilució isotòpica permet la determinació acurada de les tres espècies a la mostra sense necessitat de cap calibratge extern o addició de patró a la mostra, cosa que representa un avantatge addicional respecte a altres metodologies.
3. El mètode s'ha validat mitjançant l'anàlisi de materials de referència i realitzant estudis de recuperació, amb bons resultats.
4. El mètode desenvolupat s'ha aplicat a l'anàlisi de mostres reals, peixos i mol·luscs provinents del mar Menor. S'han obtingut resultats comparables a altres estudis previs en altres àrees d'Espanya.

---

## 4.5. REFERÈNCIES

- 4.1- MANAHAN SE (2007) *Introducción a la química ambiental* (1a ed.) Barcelona: Editorial Reverté
- 4.2- MARR IL, CRESSER MS, GÓMEZ ARIZA JL (1989). *Química analítica del medio ambiente* (1a ed.) Sevilla: Editorial Universidad de Sevilla
- 4.3- DEVOS C et al. (2005) Automated headspace-solid-phase micro extraction-retention time locked-isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of organotin compounds in water and sediment samples. *J Chromatogr A* 1079:408-414
- 4.4- BURTON ED, PHILLIPS IR, HAWKER DW (2005) In-situ partitioning of butyltin compounds in estuarine sediments. *Chemosphere* 59:585-592
- 4.5- OROZCO BARRENETXEA C, PÉREZ SERRANO A, GONZÁLEZ DELGADO MN, RODRÍGUEZ VIDAL FJ, ALFAYATE BLANCO JM (2003) *Contaminación ambiental: Una visión desde la química* (1a ed.) Madrid: Thomson editores
- 4.6- ARIESE F et al. (1999) Evaluation of the state-of-the-art of butyl- and phenyltin compound determinations in freshwater sediment prior to certification of a reference material. *J Environ Monit* 1:191-196
- 4.7- GARCÍA ALONSO JI et al. (2002) Determination of butyltin compounds in environmental samples by isotope-dilution GC-ICP-MS. *Anal Bioanal Chem* 373:432-440
- 4.8- GÓMEZ-ARIZA JL et al. (2006) Organotin contamination in the Atlantic Ocean off the Iberian Peninsula in relation to shipping. *Chemosphere* 64:1100-1108
- 4.9- DUBEY SK, ROY U (2003) Biodegradation of tributyltins (organotins) by marine bacteria. *Appl Organometal Chem* 17:3-8
- 4.10- GUI-BIN J, QUN-FANG Z, BIN H (2000) Speciation of organotin compounds, total tin, and major trace metal elements in poisoned human organs by gas chromatography-flame photometric detector and inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Environ Sci Technol* 34:2697-2702
- 4.11- CAMPILLO N et al. (2004) Speciation of organotin compounds in waters and marine sediments using purge-and-trap capillary gas chromatography with atomic emission detection. *Anal Chim Acta* 525:273-280
- 4.12- GÓMEZ-ARIZA JL et al. (2002) Determination of methyltin species in sediments using a pervaporation-gas chromatographic approach. *Appl Organometal Chem* 16:210-215



- 4.13- CENTINEO G et al. (2006) Isotope dilution GC-MS routine method for the determination of butyltin compounds in water. *Anal Bioanal Chem* 384:908-914
- 4.14- MORABITO R, MASSANISSO P, QUEVAUVILLER P (2000) Derivatization methods for the determination of organotin compounds in environmental samples. *Trac-Trends Anal Chem* 19:113-119
- 4.15- RUIZ ENCINAR J et al. (2002) Evaluation of extraction techniques for the determination of butyltin compounds in sediments using isotope dilution-GC/ICPMS with  $^{118}\text{Sn}$  and  $^{119}\text{Sn}$ -enriched species. *Anal Chem* 74:270- 281
- 4.16- SANZ E, MUÑOZ-OLIVAS R, CÁMARA C (2005) Evaluation of a focused sonication probe for arsenic speciation in environmental and biological samples. *J Chromatogr A* 1097:1-8
- 4.17- MARÍN A, LÓPEZ-GONZÁLVEZ A, BARBAS C (2001) Development and validation of extraction methods for determination of zinc and arsenic speciation in soils using focused ultrasound application to heavy metal study in mud and soils. *Anal Chim Acta* 442:305-318
- 4.18- NASCENTES CC, KORN M, ARRUDA MAZ (2001) A fast ultrasound-assisted extraction of Ca, Mg, Mn and Zn from vegetables. *Microchem J* 69:37-43
- 4.19- CASSI R et al. (2002) Organotin speciation analyses in marine biota using sodium tetraethylborate ethylation and gas chromatography with flame photometric detection. *Appl Organometal Chem* 16:355-359
- 4.20- THOMAIDIS NS, ADAMS FC, LEKKAS TD (2001) A simple method for the speciation of organotin compounds in water samples using ethylation and GC-QFAAS. *Microchim Acta* 136:137-141
- 4.21- BOTANA JC, RODRÍGUEZ PEREIRO I, CELA TORRIJOS R (2002) Rapid determination of butyltin species in water samples by multicapillary gas chromatography with atomic emission detection following headspace solid-phase microextraction. *J Chromatogr A* 963:195-203
- 4.22- HOCH M (2001) Organotin compounds in the environment - an overview. *Appl Geochem* 16:719-743
- 4.23- GARCÍA FERNÁNDEZ R et al. (2000) Comparison of different derivatization approaches for mercury speciation in biological tissues by gas chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 35:639-646
- 4.24- RUIZ ENCINAR J et al. (2003) Isotopically-labelled compounds for validating organometallics speciation analysis. *Trac-Trends Anal Chem* 22:108-114
- 4.25- RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ P et al. (2005) Isotope dilution analysis for elemental speciation: A tutorial review. *Spectrochim Acta Pt B* 60:151-207

- 
- 4.26- HIRNER AV, EMONS H (Eds.) (2004) *Organic metal and metalloid species in the environment* (1a ed.) Berlin: Springer-Verlag
- 4.27- HEUMANN KG (2004) Isotope-dilution ICP-MS for trace element determination and speciation: from a reference method to a routine method? *Anal Bioanal Chem* 378:318-329
- 4.28- CENTINEO G et al. (2004) Simultaneous determination of mono-, di- and tributyltin in environmental samples using isotope dilution gas chromatography mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 39:485-494
- 4.29- MEIJA J et al. (2005) Interpretation of butyltin mass spectra using isotope pattern reconstruction for the accurate measurement of isotope ratios from molecular clusters. *J Mass Spectrom* 40:807-814
- 4.30- JIMENEZ MORENO M et al. (2006) Simultaneous determination of monomethylmercury, monobutyltin, dibutyltin and tributyltin in environmental samples by multi-elemental-species-specific isotope dilution analysis using electron ionisation GC-MS. *J Mass Spectrom* 41:1491-1497
- 4.31- TAO H et al. (1999) Tin speciation in the femtogram range in open ocean seawater by gas chromatography/inductively coupled plasma mass spectrometry using a shield torch at normal plasma conditions. *Anal Chem* 71:4208-4215
- 4.32- MONPERRUS M et al. (2004) Potential and limits of speciated isotope-dilution analysis for metrology and assessing environmental reactivity. *Trac-Trends Anal Chem* 23:261-272
- 4.33- PELLEGRINO C, MASSANISSO P, MORABITO R (2000) Comparison of twelve selected extraction methods for the determination of butyl- and phenyltin compounds in mussel samples. *Trac-Trends Anal Chem* 19:97-106
- 4.34- GÓMEZ-ARIZA JL et al. (2001) Sample treatment in chromatography-based speciation of organometallic pollutants. *J Chromatogr A* 938:211-224
- 4.35- SHAWKY S, EMONS H (1998) Distribution pattern of organotin compounds at different trophic levels of aquatic ecosystems. *Chemosphere* 36:523-535
- 4.36- SHORT JW, THROWER FP (1986) Accumulation of Butyltins in Muscle Tissue of Chinook Salmon Reared in Sea Pens Treated with Tri-n-Butyltin. *Mar Pollut Bull* 17:542-545
- 4.37- ELGETHUN K, NEUMANN C, BLAKE P (2000) Butyltins in shellfish, finfish, water and sediment from the Coos Bay estuary (Oregon, USA). *Chemosphere* 41:953-964
- 4.38- HONG HK et al. (2002) Butyltin residues in blue mussels (*Mytilus edulis*) and arkshells (*Scapharca broughtonii*) collected from Korean coastal waters. *Environ Pollut* 117:475-486

- 4.39- HWANG HM et al. (1999) Tributyltin compounds in mussels, oysters and sediments of Chinhae Bay, Korea. *Mar Environ Res* 47:61-70
- 4.40- GOMEZ-ARIZA JL, GIRALDEZ I, MORALES E (2001) Occurrence of organotin compounds in water, sediments and mollusca in estuarine systems in the southwest of Spain. *Water Air Soil Pollut* 126:253-270
- 4.41- KANNAN K et al. (1995) Butyltins in muscle and liver of fish collected from certain Asian and Oceanian countries. *Environ Pollut* 90:279-290
- 4.42- TAKAHASHI S et al. (1999) Distribution and Specific Bioaccumulation of Butyltin Compounds in a Marine Ecosystem. *Arch Environ Contam Toxicol* 37:50-61
- 4.43- HARINO H et al. (1998) Contamination of butyltin and phenyltin compounds in the marine environment of Otsuchi Bay, Japan. *Environ Pollut* 101:209-214
- 4.44- HARINO H, FUKUSHIMA M, KAWAI S (2000) Accumulation of Butyltin and Phenyltin Compounds in Various Fish Species. *Arch Environ Contam Toxicol* 39:13-19
- 4.45- HUNG TC, LEE TY, LIAO TF (1998) Determination of butyltins and phenyltins in oysters and fishes from Taiwan coastal waters. *Environ Pollut* 102:197-203
- 4.46- SUDARYANTO A et al. (2004) Contamination of butyltin compounds in Malaysian marine environments. *Environ Pollut* 130:347-358
- 4.47- SUDARYANTO A et al. (2005) Organotin residues and the role of anthropogenic tin sources in the coastal marine environment of Indonesia. *Mar Pollut Bull* 50:227-236
- 4.48- TONG SL et al. (1996) Tributyltin distribution in the coastal environment of peninsular Malaysia. *Environ Pollut* 91:209-216



## **CONCLUSIONS**



Els resultats dels estudis presentats en aquesta memòria han permès extreure una sèrie de conclusions que s'han detallat en els capítols respectius, i de les quals es poden destacar les següents:

1. S'ha constatat l'elevat contingut de metalls en els sediments del mar Menor, en els quals s'han determinat concentracions que varien entre 5.000-8.000 mg kg<sup>-1</sup> i 2.000-3.000 mg kg<sup>-1</sup> en el cas de Pb per als sediments provinents de la desembocadura de les rambles de Beal i Carrasquilla, respectivament i 5.000-8.000 mg kg<sup>-1</sup> i 3.000-5.000 mg kg<sup>-1</sup> per a Zn. En el cas del sediment provinent de la desembocadura de Ponce, els valors trobats són més baixos i varien entre 700-1.000 mg kg<sup>-1</sup> i 600-1.500 mg kg<sup>-1</sup> per a Pb i Zn, respectivament. La determinació dels sulfurs volàtils (AVS) i dels metalls extrets simultàniament (SEM) indica que els sulfurs no són la fase enllaçant principal en els sediments contaminats. El fraccionament dels metalls en el sediment ha estat investigat mitjançant l'aplicació de dos esquemes d'extracció seqüencial, el proposat pel BCR i el de Tessier.
2. Els resultats de l'aplicació del procediment de fraccionament BCR mostren que Pb i Zn, que són els metalls que es troben en concentració més elevada, s'extreuen principalment en la segona etapa, indicant que es troben en forma reduïble (units a òxids de Fe i Mn). El Cd, que es troba en concentracions inferiors però, en la fracció fina del sediment, s'extreu majoritàriament en quantitat important en la primera etapa del BCR (8-65 %), fet que apunta a una mobilitat potencial elevada d'aquest metall. L'As es troba present en el sediment a nivells de concentració més baixos (30-750 mg kg<sup>-1</sup>) mentre que per a Cu i Ni s'han determinat valors en l'interval 19-130 mg kg<sup>-1</sup>. Aquests tres metalls resten en la fracció residual, indicant que es troben enllaçats en l'estructura mineral del sediment, per la qual cosa no es consideren mòbils o disponibles.
3. S'ha investigat la mobilitat potencial dels metalls en mostres de diferents tipus de residus de mineria de la Sierra de Cartagena. La comparació de l'aplicació del test de lixiviació DIN 38414-S4 i del procediment d'extracció BCR posa de manifest el fet que l'extracció dels metalls en el test de lixiviació està governada pel pH dels residus, mentre que no és

així en l'aplicació del procediment BCR, el qual comença amb una etapa d'extracció en medi àcid. Dels resultats obtinguts es pot deduir que la mobilitat potencial dels metalls està determinada pel tractament que ha originat el residu juntament amb la seva composició.

4. L'anàlisi per components principals de les dades obtingudes a partir de l'aplicació de l'esquema d'extracció seqüencial BCR a mostres de residus, sediments marins i sediments de les rambles ha permès obtenir agrupacions entre els metalls i obtenir certs valors extrems, però no evidencia una agrupació clara de les mostres ni relacions entre elles. L'aplicació del model multivariant PARAFAC sobre les mostres estudiades permet aprofundir en l'estructura de les dades i observar les relacions presents. En general, podem diferenciar, per una banda, les mostres provinents de la conca de la rambla de Beal i, per altra banda, podem diferenciar entre les mostres corresponents a residus de les corresponents a sediments.
5. Els experiments utilitzant biofilm i algues verdes per a estudiar la bioacumulació de metalls, realitzats en el camp i en el laboratori, han permès constatar el fet que l'exposició dels organismes als sediments altament contaminats provoca un augment en l'acumulació de metalls en aquests. En general, les concentracions acumulades en els organismes exposats a sediment provinent del punt de referència sempre són baixes i molt inferiors a la dels exposats a sediment provinent de la desembocadura de les rambles. Generalment, els exposats a sediment provinent de la desembocadura de la rambla de Beal són els que presenten les concentracions més elevades de metall acumulat, seguit dels organismes desenvolupats o exposats a sediment provinent de la desembocadura de Ponce i Carrasquilla.
6. S'ha avaluat la tècnica DGT per a determinar la concentració de metall en l'aigua del mar Menor, en experiments de camp i laboratori, arribant a conclusions similars que les obtingudes en els experiments d'acumulació amb organismes. S'ha observat que les concentracions de metalls en l'aigua provinent del punt de referència són baixes i augmenten en situar-nos en la desembocadura de les rambles estudiades, d'aquesta manera s'han determinat concentracions que varien de 5,25 a 35 ppb en el cas de Pb, de 8,6 a 70 ppb per a Zn i de 0,133 a 6 ppb en el cas de Cd.

7. Els resultats obtinguts en els experiments de bioacumulació de metalls són consistents amb les concentracions de metalls en aigua de diferents punts del mar Menor, determinades mitjançant les tècniques DGT i ASV. Aquestes mesures es poden relacionar amb la mobilitat dels metalls predita pel fraccionament dels metalls en els sediments.
  
8. S'ha desenvolupat un mètode simple per a la determinació simultània de tributilestany (TBT) i els seus metabòlits, dibutilestany (DBT) i monobutilestany (MBT), en organismes marins. El mètode es basa en l'ús d'una sonda d'ultrasons per a l'extracció dels anàlits, que permet reduir el temps de tractament de la mostra a minuts. La quantificació de les espècies de butilestany en l'extracte es realitza mitjançant anàlisi per dilució isotòpica i GC-MS. Aquest mètode s'ha aplicat a peixos i bivalves provinents del mar Menor obtenint resultats comparables a altres estudis realitzats en diferents àrees d'Espanya. Les concentracions obtingudes es troben en els rangs 8,4-1.000 ng Sn g<sup>-1</sup>, 4,7-550 ng Sn g<sup>-1</sup> i 3,5-540 ng Sn g<sup>-1</sup> per TBT, DBT i MBT respectivament.







## AGRAÏMENTS

Al final d'aquesta tesi ja només em queda agrair a totes les persones que m'han donat suport i ajudat no tan sols en la realització d'aquesta sinó també a aquelles persones que m'han ajudat a passar les estones i a distreure'm quan em convenia. He pensat molt en com escriure aquests agraïments i, paradoxes de la vida, ara em trobo amb una pàgina en blanc que no sé com omplir, però bé ja anirem fent...com tot a la vida!

La primera persona a qui voldria expressar el meu agraïment més sincer és a la meva directora de tesi, la Dra. Manuela Hidalgo, ja que sense ella res de tot això no hauria estat possible. Moltíssimes gràcies Nela per permetre'm fer realitat un somni. Finalment, ja la tenim!!!

Moltes gràcies també a tots els companys i companyes de l'Àrea de Química Analítica per fer que la feina sigui molt més agradable i per brindar-me tota l'ajuda que m'ha calgut. Gràcies Victòria i Juanma per tots els consells i les idees que m'heu donat al llarg d'aquests anys. Enriqueta, gràcies per ser-hi sempre que se't necessita. Mònica, hem compartit un petit espai sense estorbar-nos i hem intentat superar tots els "agobiassos"! Esperem que tot es solucioni aviat. Clàudia, ets una gran amiga, tu ja ho saps (després de tantes confidències i riures plegades), que a partir d'ara ens puguem reunir per riure de tot el passat! Sònia, vaig començar amb tu i els teus pesticides i et vas convertir en una gran amiga, gràcies pel teu somriure sempre a punt malgrat tots els problemes que puguis tenir al cap. Vull recordar totes les analítiques ja doctores: Carol, Eva, Sara, Marta, de totes guardo un record especial. Mercè, hem passat tots els "calvaris" juntes, llàstima que al final ens hàgim hagut de separar però espero el dia que t'aplaudiré com a doctora (que tot arribarà, eh!), molts ànims en totes les aventures que et depari la vida. Mireia, fins fa poc la meva parella de fet (ara que ja ets una dona de bé s'ha acabat festejar! ☺), tots els viatges i estones plegades s'han fet curtíssimes. Molts ànims en aquest últim tram, ja et queda un sospir! I ara una mirada a les noves generacions que mantenen viva l'àrea: Raquel, Chantal. Nuri, Ester, Mònica, molts ànims en la vostra feina! Finalment agrair la feina feta als tècnics de laboratori, Anna, Josep, Vero i Sílvia, moltes gràcies per l'ajuda al laboratori. Maira, gràcies per la teva ajuda en la realització de part d'aquesta tesi.

Aquesta tesi no s'hagués pogut realitzar sense els coneixements i les idees de la Dra. Anita Geiszinger i la Dra. Helena Guasch, així com l'ajuda del Dr. Arnaldo Marín i el Dr. Lázaro Marín, gracias por vuestra colaboración en la toma de muestras de biofilm. Vull agrair al Dr. Romà Tauler tots els consells i les tardes dedicades per ajudar-me a realitzar el tractament estadístic i permetre'm aprendre noves metodologies de treball. Els meus agraïments també a la Dra. Conxi Rodríguez que es va prestar a ajudar-nos en el mostreig de les algues verdes. També voldria agrair el suport rebut dels Serveis Tècnics de Recerca de la Universitat de Girona, en especial a la Dra. Lluïsa Matas per facilitar-me la feina amb l'ICP-MS i el microones.

Una part d'aquesta tesi s'ha realitzat al "Departamento de Química y Ciencia de los Materiales" de la Universidad de Huelva. Muchas gracias José Luis y Daniel por acogerme tan bien durante mi estancia y por darme la oportunidad de trabajar con vosotros y aprender nuevas técnicas de trabajo. Mi agradecimiento también a toda la gente del grupo por su acogimiento y ofrecerme una experiencia inolvidable.

Citant un professor de la carrera diré que "la química no ho és tot però tot és química". Bé, doncs durant la realització d'aquesta tesi hi ha hagut molta gent que m'ha acompanyat en moments i fets. A tota aquesta gent vull donar-los les gràcies per distreure'm quan ho necessitava: Jordi i Judit amb l'Albert, Pablo i Montse amb en Pau. Al grup de treball de Rockendall, especialment a l'Anabella, l'Ariadna, l'Àngel i la Paula amb qui he passat llargues estones multiplicant, dividint i jugant en la nostra 'botiga de gossos' particular. Gràcies a la gent de CALMA Blanes, en especial a la Mayte, per donar-me la calma que necessitava (tens molta paciència Mayte!!).

Un agraïment molt gran als meus pares, perquè sempre esteu aquí quan us necessito i sempre heu lluitat per mi. I als meus germans, l'Anna, una amiga amb qui sempre puc comptar pel que sigui, i en Domènec, que s'ha fet gran de cop i ja és un home fet. Molta sort en la vostra vida i en tot el que feu nois!!

Ja només em queda agrair a la persona amb qui comparteixo la meva vida (bons i mals moments) i amb qui he encetat una nova família. Miquel, gràcies per estar sempre al meu costat. Ja fa temps que fem aquest camí, més costerut del que ens agradaria però junts sempre es fa molt més planer i quan es fa fosc sé que puc comptar amb la teva mà per esperar que torni a sortir el sol. I ara en Jordi ens il·lumina a tots! Ets la nostra joia!!

Gràcies a tots per ser part de la meva vida.

MARTA





