



UCA

Universidad
de Cádiz

Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y
Tecnologías del Medio Ambiente

Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales

Criterios de Calidad Ambiental

Aplicación a Aguas Limitadas del Golfo de Cádiz

María del Carmen Garrido Pérez

Cádiz, Septiembre de 2002



Castillo de Sancti Petri



**Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y
Tecnologías del Medio Ambiente**
Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales

Criterios de Calidad Ambiental

Aplicación a Aguas Limitadas del Golfo de Cádiz

María del Carmen Garrido Pérez

Cádiz, Septiembre de 2002



Criterios de Calidad Ambiental Aplicación a Aguas Limitadas del Golfo de Cádiz

Memoria presentada por la Licenciada Dña. M^a Carmen Garrido Pérez para optar al Grado de Doctora Ingeniera Química por la Universidad de Cádiz.

Fdo: María del Carmen Garrido Pérez
Cádiz, Septiembre de 2002

LA PRESENTE TESIS DOCTORAL HA SIDO DIRIGIDA POR LOS DOCTORES D. DIEGO SALES MARQUEZ, CATEDRÁTICO DEL ÁREA DE TECNOLOGÍAS DEL MEDIO AMBIENTE Y D. ENRIQUE NEBOT SANZ, PROFESOR TITULAR DEL ÁREA DE TECNOLOGIAS DEL MEDIO AMBIENTE

LOS DIRECTORES:

Fdo: Diego Sales Márquez

Fdo: Enrique Nebot Sanz

V^oB^o:

Fdo: Enrique Martínez de la Ossa Fernández.
Director del Departamento de Ingeniería Química,
Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente

En esta página quiero expresar mi más profundo agradecimiento a todas aquellas personas que han convivido conmigo y me han sufrido durante el periodo de tiempo que me ha llevado la elaboración de este trabajo.

Al Prof. Dr. D. Diego Sales Márquez, director de la presente memoria, quiero agradecerle su confianza y el cariño que me ha brindado desde que entré en el Departamento. He tenido la gran suerte de compartir muchas horas de trabajo con él, y aunque hayan pasado ya algunos años, nunca deja de sorprenderme su capacidad de trabajo e inteligencia. Nunca encontrare las palabras suficientes para agradecerle todo lo que ha hecho por mí y por todo el grupo.

Al Prof. Dr. D. Enrique Nebot Sanz, director de la presente memoria, por la gran paciencia que me ha demostrado sobre todo en los últimos meses, y por su gran ayuda, siempre práctica, siempre útil. Desde hace varios años, Enrique se ha convertido en el motor de un pequeño grupo de trabajo en el cual me siento muy orgullosa de pertenecer.

Al Prof. Dr. D. José María Quiroga, que aunque no es director de la memoria, es mi otro "gran jefe". Le agradezco muchísimo la paciencia que ha demostrado durante todos estos años llevando el gran peso que es la administración de este Grupo de Investigación.

Además, deseo expresar mi agradecimiento formal a los diferentes grupos de investigación de la Universidad de Cádiz, que han participado y participan en la actualidad en los siguientes Convenios de Colaboración entre la Universidad de Cádiz y la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía:

- Establecimiento de los objetivos de calidad de las aguas del litoral andaluz (1995-1996).*
- Evaluación de procesos ecotoxicológicos en especies acuáticas comunes de la Comunidad Autónoma Andaluza. (1998-2000).*
- Definición y desarrollo de controles de investigación para determinar la magnitud de la contaminación accidental y de los impactos producidos por episodios contaminantes en el litoral andaluz (2002-2004)*

Mi más sincero agradecimiento a la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía por la financiación de este trabajo de investigación a través de los anteriores proyectos.

A todas aquellas personas que me han ayudado en estos años a la ejecución y finalización del presente trabajo de investigación y a todos los que me han demostrado siempre un cariño sincero. A mis compañeras de laboratorio por la ayuda en la puesta a punto de técnicas analíticas en agua de mar. A mis compañeros del proyecto de "Ecotoxicología", en especial a Javier Benavente, Antonio Tovar, Juan Bosco Ortiz y a Manuel Antonio González del Valle (Checo), y por supuesto, a los investigadores responsables de cada grupo de investigación. A D. Luis Lubián Chaichio por haberme proporcionado las microalgas utilizadas en los ensayos de toxicidad. A Dña. María del Carmen Sarasquete por proporcionarme las diferentes cepas de Artemia. Mi más sincero agradecimiento al Prof. Kooijman por el tiempo que me dedicó en la Vrije Universiteit de Amsterdam al estudio, modelización y comprensión de la biología de las microalgas de ensayo.

A mi pequeño grupo de trabajo. Nunca tendré palabras suficientes para agradeceros la compañía, el trabajo, la complicidad y fundamentalmente la gran ayuda y el cariño que todos los días me demostráis.

A mis compañeros del grupo de investigación de Tecnologías del Medio Ambiente por los "grandes" momentos, buenos y regulares (nunca malos), que hemos pasado en estos años. Ha habido semanas de mucho trabajo, pero también ha habido muchos ratos de risas y complicidad. De este gran grupo he sacado muchos y buenos amigos que me han demostrado durante estos años su paciencia, cariño, y amistad. Mis "niñas"... mi "Rosita" que ha sido mi hermana pequeña del grupo... Inma "la torbellino" mi compañera de mesa de tantos años... Natalia la más dulce, trabajadora y hormigueta... Asun nunca tendré palabras para agradecerte tu cariño y todo lo que haces por mí... Lola con sus "rizos tiesos" cuando hay mucho trabajo... Charo y esas largas conversaciones que tuvimos el año pasado, ella agobiada con su "plaza", yo con mi "tesis", siempre buscábamos un ratito para despejarnos la cabeza... Loli mi primera amiga del grupo, seguimos siendo amigas... Los "niños"... Selu, Jordi, los Manolos, Jesús, Carlos, los Antonios, Pupi (Miguel)... Mis "QuiFi" favoritos... Quique y Monica... Mis amigas de hace tantos, tantos años, Chari, Alicia, Silvia, Susana, Esperanza, Angelita...

A José Antonio Perales (Pera). Este año ha sido un año grande para los dos... Muchas gracias por el amor, la comprensión, la "gran paciencia" que me demuestras todos los días. Muchas gracias por tu ayuda... siempre me ayudas muchísimo aunque tú digas que no.

A mi "gran" familia, que siempre me ha querido tanto... mis hermanos Jose, Macarena y Jesús... y en especial y con todo mi cariño, le dedico este trabajo a mis padres, José Luis y Carmen.



Criterios de Calidad Ambiental

Aplicación a Aguas Limitadas del Golfo de Cádiz

ÍNDICE DEL DOCUMENTO

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO II. CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE LAS ÁREAS DE ESTUDIO

CAPÍTULO III. ENSAYOS DE TOXICIDAD

CAPÍTULO IV. DETERMINACIÓN DE CRITERIOS DE CALIDAD AMBIENTAL

BIBLIOGRAFÍA

ANEXOS

| | |
|-------------|--|
| ANEXO I. | PARÁMETROS DE ESTUDIO. METODOS DE ANÁLISIS |
| ANEXO II. | RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL LAS |
| ANEXO III. | RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL TERGITOL |
| ANEXO IV. | RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL FENOL |
| ANEXO V. | RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL LINDANO |
| ANEXO VI. | RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL COBRE |
| ANEXO VII. | RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL CADMIO |
| ANEXO VIII. | RESULTADOS OBTENIDOS PARA EL ZINC |
| ANEXO IX. | RESULTADOS OBTENIDOS PARA LAS Y AGUAS RECEPTORAS |
| ANEXO X. | RESULTADOS AGUAS RECEPTORAS |
| ANEXO XI. | COEFICIENTES ESTADÍSTICOS |
| ANEXO XII. | PROTOCOLOS DE LIMPIEZA |
| ANEXO XIII. | REACTIVOS UTILIZADOS. ABREVIATURAS |

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Resumen

En este capítulo de introducción se incluye información diversa para facilitar una mejor comprensión del trabajo de investigación realizado. En las primeras páginas se describe de forma resumida la estructura que se ha seguido en la organización de este documento, y los objetivos principales del trabajo de investigación. Posteriormente, se realiza una breve mención de las principales normativas de calidad de aguas y vertidos al litoral, prestando una especial atención a las disposiciones incluidas en la nueva Directiva 60/2000/CE, Marco de Aguas, y en la Orden de 14 de febrero de 1997, por la que se clasifican las aguas litorales andaluzas. Para finalizar este capítulo, se fundamentan las razones por las cuales se han seleccionado las aguas litorales de estudio, los compuestos ensayados y las especies utilizadas en los ensayos de toxicidad.

Objetivos

El objetivo fundamental de este capítulo es ofrecer una visión general del trabajo realizado y de los antecedentes sobre los que se fundamenta.

INDICE DEL CAPÍTULO I

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. ESTRUCTURA DEL DOCUMENTO..... | 3 |
| 3. OBJETIVOS DE LA TESIS..... | 6 |
| 4. TENDENCIAS LEGISLATIVAS EN MATERIA DE CALIDAD DE AGUAS..... | 7 |
| 4.1. DIRECTIVA MARCO 60/2000/CE, MARCO DE AGUAS..... | 7 |
| 4.2. NORMATIVA DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA ANDALUZA REFERENTE A CALIDAD DE AGUAS LITORALES..... | 15 |
| 4.3. CLASIFICACIÓN DE LAS ÁREAS AMBIENTALES SEGÚN DIFERENTES NORMAS..... | 16 |
| 5. CONSIDERACIONES PREVIAS RELATIVAS A LA SELECCIÓN DE VARIABLES..... | 19 |
| 5.1. CONSIDERACIONES RESPECTO A LAS ÁREAS DE ESTUDIO..... | 19 |
| 5.2. CONSIDERACIONES RESPECTO A LOS COMPUESTOS ESPECÍFICOS DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD..... | 20 |
| 5.3. CONSIDERACIONES RESPECTO A LAS ESPECIES ENSAYADAS..... | 21 |

1. INTRODUCCIÓN

En la Comunidad Autónoma de Andalucía, el litoral está siendo sin duda el área de mayor tensión transformadora del espacio en los últimos decenios. La expansión turística y agrícola, así como el crecimiento poblacional y urbano del litoral, han determinado un proceso de ocupación física que, en más ocasiones de las que sería deseable, resulta ser degradante de las condiciones ambientales originarias, afectando de manera especial a la calidad de las aguas litorales. Esta ocupación se realiza además sobre un ecosistema a la vez rico, complejo y frágil, un ecosistema muy vulnerable ante cualquier manejo inadecuado y donde la regeneración de sus dinámicas, valores y cualidades es particularmente difícil.

Actualmente, en el ámbito del litoral andaluz están vigentes varios Convenios Internacionales para la prevención y control de la contaminación –el Convenio de Protección del Medio Marino del Nordeste Atlántico de Oslo y París (Convenio OSPAR) y el Convenio de Barcelona para la protección del Mediterráneo. Ambos Convenios determinan la obligación de desarrollar programas de evaluación y vigilancia de la calidad del medio marino en las aguas Atlánticas y Mediterráneas de la Comunidad Autónoma Andaluza. Por otra parte, la reciente aprobación de la Directiva 60/2000/CE del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un marco comunitario de actuación en el ámbito de la política de aguas (DOCE, 2000), determina la implantación de nuevas estrategias para el control de la contaminación de las aguas, entre las que cabe destacar la definición de una nueva lista de sustancias prioritarias, la identificación de las fuentes (puntuales y difusas), la determinación de los estados ecológicos de las aguas superficiales, y el establecimiento de estándares de calidad de las aguas a partir de niveles ecotoxicológicos que aseguren la protección de la vida acuática, y por extensión, al hombre.

Una de las disposiciones que marca la Directiva es que cada país miembro tiene la potestad (y el deber) de desarrollar normas de calidad ambiental propias y adaptadas a las condiciones naturales y/o particularidades de sus aguas. Por supuesto estas "normas particulares" se admiten siempre que no contradigan las normas generales impuestas a nivel comunitario, o bien, contemplar algunas peculiaridades del sistema acuático que no permiten cumplir con los criterios europeos, justificándolo desde un punto de vista científico.

La Comunidad Autónoma Andaluza adelantándose a esta norma comunitaria, tiene desarrollada desde hace seis años, una legislación particular relativa a la regulación de los vertidos en aguas litorales y los objetivos de calidad de estas aguas (Decreto 14/1996, de 16 de enero, por el que se aprueba el Reglamento de la calidad de las aguas litorales y Orden de 14 de febrero de 1997 por la que se clasifican las aguas litorales andaluzas y se establecen los objetivos de calidad de las aguas en cumplimiento del Decreto 14/1996). Además, estas normas clasifican las aguas andaluzas en cuatro categorías en función de criterios ecológicos e hidromorfológicos, por tanto, en este sentido también se adelanta a la norma europea.

Para el desarrollo de esta legislación, la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía firmó en 1995 un convenio de colaboración con el grupo de investigación de Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Cádiz para la realización del documento denominado "*Establecimiento de los Objetivos de Calidad de las Aguas del Litoral Andaluz*" (Sales-Márquez y López-Aguayo, 1996). Este documento basado en información bibliográfica existente y disponible, serviría como base científica para establecer los objetivos de calidad de las aguas afectadas por vertidos, además de establecer una zonificación del litoral andaluz en base a las cuatro definiciones de aguas que se establecen en el Reglamento de la calidad de las aguas litorales.

Posteriormente a éste, la administración andaluza ha firmado otros convenios de colaboración con la Universidad de Cádiz relacionados con la calidad de las aguas. En 1997, firmó el convenio para la "*Evaluación de procesos ecotoxicológicos en especies acuáticas del litoral andaluz*". Uno de los objetivos de este convenio ha sido controlar el estado de calidad ambiental de varias áreas del litoral andaluz, a partir del control fisicoquímico de las aguas y el control biológico de las especies acuáticas presentes. En el informe final del proyecto, se incluyó un apartado en el cual se analizaban críticamente los objetivos de calidad de la normativa en función de los resultados analíticos obtenidos. En la actualidad, este convenio sigue vigente bajo

el nombre de *"Definición y desarrollo de controles de investigación para determinar la magnitud de la contaminación accidental y de los impactos producidos por episodios contaminantes en el litoral andaluz"* el cual mantiene los objetivos del primero pero trasladando las áreas de estudio a otras zonas problemáticas del litoral andaluz.

Una de las conclusiones más significativas obtenida en el informe final anteriormente mencionado, es que los objetivos de calidad vigentes no están bien formulados, bien porque los niveles naturales superan en un gran porcentaje de casos estos objetivos de calidad, o bien porque estos niveles están muy por debajo de los criterios de calidad ambiental, y por tanto, es posible que éstos no sean operativos pues no protegen el medio ambiente.

El presente trabajo de investigación se diseñó con el objetivo fundamental de comprobar de forma más exhaustiva y formal la adecuación de los objetivos de calidad vigentes de las aguas andaluzas al estado de calidad ambiental actual de las aguas.

Las diferentes propuestas de Directiva Marco de Aguas, y la posterior aprobación de ésta en diciembre de 2000, confirmaron que el diseño del presente trabajo de investigación y de los objetivos a cubrir están de acuerdo con las tendencias actuales de la Unión Europea en materia de aguas.

"Trabajar" con agua de mar no es tarea fácil, por tanto y por extensión, establecer herramientas y procedimientos para elaborar criterios de calidad ambiental tampoco lo es. Por ello, ha sido necesario ejecutar un gran número de estudios, y obtener un gran número de resultados al objeto de que las conclusiones obtenidas estuvieran bien fundamentadas. Si bien este trabajo de investigación puede parecer por su extensión, un poco largo y tedioso, todos los estudios incluidos son necesarios y han permitido obtener desde la particularidad de cada uno de ellos, una visión global del estado de calidad ambiental de las áreas litorales estudiadas.

2. ESTRUCTURA DEL DOCUMENTO

El presente trabajo de investigación puede dividirse en dos grandes bloques:

- ✘ Estudios realizados con variables físico-químicas
- ✘ Estudios de toxicidad

Al objeto de ordenar y separar ambos bloques, la estructura del documento se ha realizado por capítulos, incluyendo un primer capítulo general de introducción (presente capítulo), un segundo capítulo en el que se centran los estudios físico-químicos, un tercer capítulo en el que se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad y un cuarto capítulo en el cual se utilizan los resultados obtenidos en el segundo y tercer capítulo para el diseño de criterios de calidad ambiental en aguas litorales.

Los capítulos II, III incluyen al final un apartado en el cual se resumen las conclusiones obtenidas en los diferentes estudios. Puesto que el capítulo IV es el capítulo de síntesis de los resultados, se considera que las conclusiones incluidas en éste, son las conclusiones globales del presente trabajo de investigación.

Finalmente, el documento termina con la bibliografía citada, más un anexo en el cual se detallan todos los análisis de datos realizados en los ensayos de toxicidad. Debido al gran volumen de información del anexo, se ha preferido incluir éste en un CD-Rom junto con el documento en formato pdf (portable document format).

El contenido de cada capítulo se detalla a continuación:

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Una de las finalidades principales del presente trabajo es desarrollar herramientas de trabajo para la ejecución en los próximos años de la Directiva 60/2000/CE Marco de Aguas, la cual refunde todos los aspectos relacionados con el agua, y por tanto la protección de todos los ambientes acuáticos, en una única norma básica. Una vez que esta Directiva se haya consolidado en nuestra legislación y se hayan marcado los plazos de ejecución a nivel nacional de las disposiciones que contiene, corresponde a cada país miembro ejecutar diversos programas al objeto de caracterizar, identificar y clasificar los sistemas acuáticos en función de su calidad ecológica y química. Dentro de España, esta labor corresponderá a cada una de las Comunidades Autónomas que tengan transferidas las competencias en materia de medio ambiente.

En el apartado de *Introducción* ya se ha comentado que la Comunidad Autónoma Andaluza tiene desarrollada su propia legislación relativa a vertidos y objetivos de calidad en aguas litorales, siempre por supuesto, de acuerdo con las normas que dicta la Unión Europea y el estado español.

Por tanto, y debido a la trascendencia que tiene la normativa vigente en materia de calidad de aguas en el presente trabajo de investigación, en este *Capítulo I* se ha realizado un resumen de la norma europea y andaluza, mostrando las disposiciones más significativas de ellas y en las cuales se encuadraría el presente trabajo de investigación.

Una parte importante en esta tesis ha sido el diseño y ejecución de ensayos de toxicidad para la aplicación de la Directiva 60/2000/CE Marco de Aguas en relación con la obtención de normas de calidad química de compuestos contaminantes. Para ello se ha seleccionado un conjunto de compuestos químicos legislados en la normativa andaluza de calidad de aguas y se han seleccionado un grupo de organismos marinos para la realización de estos ensayos. En este capítulo también se justifica la selección realizada.

Finalmente, y si bien en cada capítulo se muestran los objetivos a cubrir en cada uno de ellos, en el presente se realizará una exposición del objetivo principal y de los objetivos parciales.

CAPÍTULO II. CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE LAS ÁREAS DE ESTUDIO

En el *Capítulo II* se muestran los resultados obtenidos en la caracterización físico-química de cuatro áreas litorales pertenecientes a las costas de Huelva y Cádiz. Dentro de este capítulo, se pueden distinguir dos partes principales.

La primera parte del capítulo se corresponde con la exposición y examen de los resultados físico-químicos en base a diversas técnicas de análisis de datos estadísticas y representaciones gráficas. Este estudio tiene por objeto identificar tendencias espaciales de las variables individuales, tendencias en el comportamiento del conjunto de variables, al objeto de identificar los procesos que se producen en esta agua (contaminación por metales, contaminación por materia orgánica, por nutrientes, etc), y tendencias en el comportamiento de las estaciones de muestreo en base a la similitud de la composición de las aguas. En definitiva, una comprensión del **funcionamiento global del sistema acuático** de cada una de estas áreas litorales.

La segunda parte del capítulo incluye el diseño y aplicación de un índice de calidad ambiental. Tradicionalmente estos índices se han desarrollado en aguas continentales y son muy útiles a la hora de clasificar las estaciones de muestreo o las áreas ambientales en función de la calidad de las aguas. Puesto que en el estudio físico-químico se han analizado un número suficiente de variables relativas a la calidad de agua, es una ocasión excelente de diseñar y aplicar **índices de calidad físico-químico** en las aguas litorales utilizando las variables tradicionales de control de aguas y fórmulas matemáticas sencillas.

CAPÍTULO III. ENSAYOS DE TOXICIDAD

En el *Capítulo III* se muestran los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad realizados con especies acuáticas residentes en el litoral andaluz. Dentro de este capítulo, se pueden distinguir dos partes principales.

La primera parte del capítulo se corresponde con la exposición y examen de los ensayos de toxicidad realizados con un conjunto limitado de compuestos específicos. Este estudio tiene por objeto diseñar y ejecutar procedimientos para ensayar la **toxicidad de compuestos químicos**, al objeto de adaptar y aplicar la Directiva 60/2000/CE Marco de Aguas, a especies presentes en el litoral andaluz de gran relevancia ecológica. La mayoría de estos ensayos se han realizado utilizando como agua de dilución, agua de mar sintética fabricada a partir de una formulación estándar. El último apartado de este bloque de ensayos incluye una aproximación a los ensayos de toxicidad utilizando como agua de dilución, agua procedente de las áreas litorales de estudio. El objetivo de este último apartado es realizar una estimación de la extrapolación de los resultados de toxicidad de uno de los compuestos de ensayo al medio natural.

La segunda parte del capítulo incluye el diseño y aplicación de un **índice de calidad biológico** basado en la respuesta biológica de las microalgas marinas en aguas naturales. Este ensayo se basa en el tradicional *whole effluent toxicity test* utilizado ampliamente por otros países para ensayar la toxicidad de muestras complejas tales como efluentes o aguas receptoras afectadas por los vertidos de estos efluentes. Tradicionalmente este procedimiento ha sido utilizado para estimar el potencial de eutrofización de cuerpos de agua que presentan elevadas concentraciones de nutrientes. En los últimos años también se ha utilizado para ensayar la toxicidad de aguas continentales afectadas por vertidos de diferente naturaleza y composición. El procedimiento que se propone y los índices que se obtienen son una nueva propuesta para evaluar áreas problemáticas del litoral en función de criterios biológicos y mediante un procedimiento rápido y simple.

CAPÍTULO IV. DETERMINACIÓN DE CRITERIOS DE CALIDAD AMBIENTAL

Este es el capítulo central de la presente tesis doctoral. En él se utilizan los resultados obtenidos en los *Capítulos II y III* para elaborar **criterios de calidad ambiental**.

A partir de los resultados obtenidos en el *Capítulo II* se han formulado **valores guía de calidad ambiental de las variables físico-químicas tradicionales de control de aguas**. Estos valores guía son específicos para cada área litoral puesto que se han basado en las concentraciones de fondo de las variables. Además se formula un criterio general para las aguas del Golfo de Cádiz basado en el valor más permisible obtenido del conjunto de áreas. Un punto importante de este apartado, el cual constituye uno de los objetivos fundamentales de esta Tesis, es comprobar la adecuación de los objetivos de calidad vigentes respecto a los niveles de fondo de las aguas litorales andaluzas. Por tanto, en este capítulo se efectúa esta comparación y se realiza una valoración y recomendaciones para el rediseño de los objetivos de calidad vigentes en caso de que éstos no hayan resultado adecuados.

A partir de los resultados obtenidos en el *Capítulo III* se han formulado **normas de calidad ambiental** de sustancias peligrosas para organismos acuáticos residentes en el litoral. Para ello, fundamentalmente se ha seguido las directrices establecidas en el Anexo V de la Directiva 60/2000/CE, Marco de Aguas. Los valores obtenidos están referidos a concentraciones que no suponen riesgo para las comunidades acuáticas, pero por supuesto, no tienen el carácter restrictivo de las normas de calidad ambiental. Otro aspecto a destacar de este apartado es que para el desarrollo de estos valores, sólo se han utilizado los ensayos de toxicidad realizados en agua de mar sintética, por tanto, son valores generales para todas las aguas litorales del Golfo de Cádiz sin contemplar las peculiaridades de cada área litoral. En este apartado también se comparan los resultados obtenidos con los objetivos de calidad vigentes realizando las recomendaciones oportunas.

Finalmente se hace una evaluación y **conclusión final** del trabajo de investigación.

3. OBJETIVOS DE LA TESIS DOCTORAL

En el apartado anterior en el cual se ha detallado el contenido de los capítulos de este documento, se han apuntado los objetivos de la presente Tesis Doctoral. Estos son los siguientes:

El presente trabajo de investigación tiene por objetivo principal **establecer criterios de calidad ambiental de aplicación directa a las aguas litorales limitadas del Golfo de Cádiz**. Para ello, se han formulado tres objetivos parciales cada uno de los cuales se desglosará en su correspondiente capítulo. Estos son los siguientes:

OBJETIVO I.

I.1. Evaluar el estado actual de calidad ambiental de diversas áreas litorales basando este estudio en los parámetros tradicionales de control físico-químico de agua de mar y en herramientas de análisis estadísticos.

I.2. Formular y aplicar índices físico-químicos de calidad ambiental al objeto de clasificar las aguas litorales estudiadas en función del grado de calidad/contaminación de las aguas.

OBJETIVO II.

II.1. Desarrollar y aplicar protocolos para ensayar la toxicidad de compuestos específicos en agua de mar en especies residentes del Golfo de Cádiz.

II.2. Formular y aplicar índices biológicos de calidad ambiental al objeto de clasificar las aguas litorales estudiadas en función del grado de calidad de las aguas.

OBJETIVO III.

III.1. Establecer valores guía de calidad ambiental de los parámetros físico-químicos tradicionales en función de los valores de fondo caracterizados a partir del Objetivo I.1.

III.2. Establecer normas de calidad ambiental para un conjunto de compuestos específicos a partir de los resultados ecotoxicológicos obtenidos en el objetivo II.1. y aplicando el procedimiento descrito por la Directiva 60/2000/CE para el establecimiento de normas de calidad química.

4. TENDENCIAS LEGISLATIVAS EN MATERIA DE CALIDAD DE AGUAS

En el desarrollo legislativo europeo relativo a las aguas cabe distinguir tres etapas, en cada una de las cuales se ha aprobado un gran número de Directivas Comunitarias:

| | | |
|------------|-----------|---|
| I. Etapa | 1975-1986 | Directivas relacionadas con usos específicos y prioritarios del agua (aguas destinadas al consumo, baño, potables, protección de la vida piscícola, etc.), y con el control de sustancias peligrosas. |
| II. Etapa | 1991-1996 | Modificación de las Directivas anteriores (potable, baños) y aparición de nuevas directivas (aguas residuales urbanas, nitratos de origen agrícola, control integrado de la contaminación, etc). |
| III. Etapa | 1996-2002 | Consideración de objetivos ecológicos con independencia de los usos del agua y finalmente aprobación de la Directiva Marco de Aguas. |

Como visión general de todo este proceso, se puede apreciar que dentro de la actual Unión Europea ha existido una evolución en la forma de entender la problemática del agua. Al principio se enfocó el problema de la calidad del agua en función de unos usos determinados y sobre unas restricciones impuestas a determinadas sustancias peligrosas vertidas al medio acuático. Ahora el enfoque es distinto pasándose a la protección global de las masas de aguas superficiales considerando a éstas como ecosistemas acuáticos, al margen del uso o los usos a que estén destinadas. En este sentido, la normativa autonómica en Andalucía se ha adelantado a importantes normas de la Unión Europea, y más concretamente a la Directiva que gestionará la totalidad de las aguas de los Países miembros en los próximos años.

4.1. DIRECTIVA MARCO 60/2000/CE, MARCO DE AGUAS

La creciente demanda de ciudadanos y organizaciones ambientales de una mejor calidad de las aguas continentales y costeras ha sido una de las principales razones para que la Comisión Europea haya identificado la protección de las aguas como una de sus prioridades de trabajo.

La experiencia en la aplicación de las primeras directivas europeas destinadas a la protección de las aguas, ha puesto de manifiesto que aunque se han conseguido considerables progresos sobre aspectos individuales, sin embargo, la política actual sobre aguas es fragmentada tanto en términos de objetivos como de medios.

De este reconocimiento surge la Directiva 60/2000/CE Marco de Aguas con la múltiple finalidad de:

- ☑ Incorporar todos los requisitos de gestión del agua en un sistema único. En este sentido, la Directiva propone la utilización de la cuenca hidrográfica, unidad geográfica e hidrológica, como unidad de gestión en lugar de otras divisiones administrativas o políticas.
- ☑ Coordinar todos los diferentes objetivos de protección de las aguas (ecológicos, de consumo humano, de baño, de determinados hábitats, etc) y eliminar cualquier vacío que pueda existir.
- ☑ Coordinar todas las medidas adoptadas sobre problemas individuales y sectores, para alcanzar los objetivos ahora definidos de forma global. Igualmente, definir la relación entre los valores límite de emisión y los estándares de calidad.
- ☑ Incrementar la participación pública en la política de aguas para garantizar una mayor transparencia y, en consecuencia, un mayor cumplimiento de la normativa.

Comentar y resumir la totalidad de la Directiva no es fácil, por tanto y considerando que puede que no se aborden aspectos interesantes, sólo se comentarán y detallarán aquellos aspectos que tengan una

incidencia directa en los procedimientos y resultados presentados en el presente trabajo de investigación. Así pues, los aspectos a destacar son:

- i. Objetivos medioambientales de la directiva para aguas superficiales (artículo 4)
- ii. Seguimiento de las aguas superficiales (artículo 8)
- iii. Planteamiento combinado respecto a las fuentes puntuales y difusas (Artículo 10)
- iv. Estrategias para combatir la contaminación de las aguas (Artículo 16)

OBJETIVOS MEDIAMBIENTALES DE LA DIRECTIVA PARA AGUAS SUPERFICIALES

El artículo 4 establece los objetivos medioambientales para la totalidad de las aguas de la Unión Europea. Respecto a las aguas superficiales, tiene por objetivos medioambientales la **prevención del deterioro, protección, mejora y regeneración de todas las aguas superficiales** (aguas continentales -ríos y lagos-, estuarios o aguas de transición y aguas costeras) **con objeto de alcanzar un buen estado ecológico y químico de las aguas.**

SEGUIMIENTO DEL ESTADO DE LAS AGUAS SUPERFICIALES

De nada sirve establecer disposiciones para el control de las aguas si no se proporcionan las directrices mínimas que deben seguirse para el seguimiento del control de esta agua. Consciente de ello, y al objeto de obtener una visión general coherente y completa del estado ecológico y químico de las aguas, es necesario establecer programas de seguimiento según las directrices que marca la Directiva. Los puntos que deben incluir al menos estos programas son los que se citan a continuación (Anexo V de la Directiva Marco):

Anexo V. Estado de las aguas superficiales Seguimiento del estado ecológico y del estado químico de las aguas superficiales

- * Diseño del reconocimiento preliminar
- * Diseño del seguimiento ordinario
- * Diseño del seguimiento de investigación
- * Frecuencia de los muestreos y determinaciones
- * Requisitos adicionales para el seguimiento de las zonas protegidas
- * Normas de muestreo, determinaciones y análisis para indicadores de calidad
- * Clasificación y presentación del estado ecológico
- * Comparabilidad de los resultados del seguimiento biológico
- * Presentación de los resultados del seguimiento y clasificación del estado y el potencial ecológicos
- * Presentación de los resultados del seguimiento y clasificación del estado químico

Estas directrices muestran un completo programa de seguimiento en los cuales parten del análisis de la situación inicial, esto es, al comienzo de la aplicación de la Directiva, y de una programación para el control de las aguas en el futuro. También cubren la posibilidad de investigar posibles anomalías en las aguas mediante un seguimiento extraordinario.

En estos programas, también cabe destacar que se da igual importancia a la especificación de las normas de muestreo y análisis que a los resultados.

PLANTEAMIENTO COMBINADO RESPECTO A LAS FUENTES PUNTUALES Y DIFUSAS

El control de la contaminación de fuente puntual es uno de los elementos más elaborados de la gestión de las aguas por la sencilla razón de que este tipo de contaminación es uno de los problemas más fáciles de detectar y el que mejor permite tomar medidas correctoras. El principio básico consiste en imponer una autorización a las industrias o actividades contaminantes y condicionar éstas al control de la contaminación. Esto se expresa normalmente en términos de "*controles de emisión*", que fijan límites a la cantidad de contaminantes que se pueden verter en las masas de agua.

Los problemas empiezan a plantearse cuando se trata de determinar el nivel de control de emisiones necesario. Este aspecto ha sido objeto de una prolongada controversia entre dos puntos de vista extremos: el enfoque de "*objetivos de calidad ambiental*" y el enfoque de "*valores límites de emisión*".

Los ***objetivos de calidad de las aguas*** (criterios, normas, estándares, guías de calidad de las aguas, u otra terminología similar) definen los requisitos mínimos de calidad del agua para limitar el impacto acumulativo de las emisiones. Esto significa que establecen un cierto nivel de calidad del agua en el que su uso y condiciones no son peligrosas para el medio ambiente y la salud humana (incluso después de haberse vertido aguas contaminadas). Este enfoque fue utilizado principalmente en las primeras directivas de aguas (1970-1980) tales como la Directiva de aguas superficiales (DOCE, 1975), la de calidad de las aguas de baño (DOCE, 1976), la de aguas para cría de moluscos (DOCE, 1979) y la de agua potable (DOCE, 1998).

Los valores límite de emisión se centran en las cantidades máximas de contaminantes autorizadas que pueden verterse al medio desde una determinada fuente. Este enfoque, de hecho se dirige al producto final de un proceso y fija las cantidades de contaminantes que pueden verterse procedentes de distintas actividades (principalmente el tratamiento de aguas, vertidos industriales y efecto de la agricultura en la calidad de las aguas). Este enfoque ha sido utilizado fundamentalmente en el segunda etapa de aprobación de directivas sobre el agua durante los 90: Directiva de tratamiento de aguas residuales (DOCE, 1991), Directiva de nitratos (DOCE, 1991) y la Directiva IPPC (DOCE, 1996). La noción de Mejores Técnicas Disponibles se usa principalmente con el enfoque de los valores límites de emisión e implica la utilización de la fase más eficaz y avanzada del desarrollo de las actividades, de forma que se reduzcan las emisiones y el impacto en el conjunto del medio ambiente.

La cuestión de qué enfoque es el más apropiado ha sido tema de un largo debate científico y político (CCE, 1996). En la práctica, ninguno de los dos extremos ofrece la solución ideal. Los objetivos de calidad ambiental suelen ser insuficientes por sí mismos para atajar graves problemas de contaminación y pueden malinterpretarse como una "licencia para contaminar" hasta un nivel determinado. Asimismo, una estricta aplicación de los valores límite de emisión sobre la base de las Mejores Tecnologías Disponibles puede conducir en algunos casos a inversiones innecesarias sin beneficios significativos para el medio ambiente.

En la Unión Europea, la legislación más reciente adopta el enfoque de los valores límite de emisión como punto de partida, lo que es conforme al principio de cautela, y establece que la industria es la responsable, en la medida de lo razonablemente posible, de la reducción de las emisiones. Sin embargo, estas medidas serán insuficientes en algunos casos para garantizar la protección del medio ambiente, siendo entonces necesarias unas reducciones de las emisiones superiores a las Mejores Tecnologías Disponibles anteriormente descritas. Por otra parte, también se darán casos en los que las ventajas derivadas de la aplicación de las normas de las Mejores Tecnologías Disponibles generalmente utilizadas no justifiquen el coste.

Un ejemplo de este enfoque es la Directiva 91/271/CEE, del Consejo, relativa al tratamiento de las aguas residuales urbanas en la que se establece un elevado nivel de tratamiento de las aguas residuales sobre la base de consideraciones técnicas, pero cuando los vertidos se realizan en una zona "sensible" sugiere unas medidas más estrictas, permitiendo soluciones menos complejas y costosas para los vertidos en una zona "menos sensible". Asimismo, cuando las circunstancias locales permitan mantener un elevado nivel de

protección del medio ambiente en virtud de medidas menos rigurosas, los valores límite de emisión pueden tener en cuenta la situación geográfica y las condiciones ambientales locales.

En la práctica, la existencia de objetivos de calidad ambiental permite a las autoridades determinar el grado de eficacia de los valores límite de emisión adoptados e incrementar su rigor en caso necesario. A la inversa, los controles de las emisiones (basados normalmente en las Mejores Tecnologías Disponibles) constituyen el elemento clave de toda estrategia destinada a garantizar el cumplimiento de los objetivos de calidad ambiental. Por consiguiente, ambos enfoques son complementarios y no contradictorios.

Los diferentes elementos de este enfoque no han quedado reflejados siempre en una única directiva. Por ejemplo, la Directiva 76/160/CEE, del Consejo, relativa a la calidad de las aguas de baño no fija valores límite de emisión, sino que se centra fundamentalmente en detectar los casos en los que son precisas medidas adicionales para cumplir los criterios de calidad establecidos. A partir de la aprobación de la Directiva Marco de Aguas y tras unos años de adaptación, estas normativas de calidad de aguas según usos específicos quedarán integradas completamente en el desarrollo de esta norma global, por tanto, el planteamiento combinado de control de la contaminación será de aplicación general a todas las aguas costeras.

El artículo 10 de la Directiva Marco de Aguas recoge las bases a partir de las cuales se va a desarrollar en los próximos años, el planteamiento combinado para el control de la contaminación de las aguas.

Artículo 10

Planteamiento combinado respecto de las fuentes puntuales y difusas

1. Los Estados miembros velarán porque todos los vertidos en las aguas superficiales mencionados en el apartado 2 se controlen con arreglo al planteamiento combinado expuesto en el presente artículo.
2. Los Estados miembros velarán por el establecimiento y/o la aplicación de:
 - a. los controles de emisión basados en las Mejores Técnicas Disponibles; o
 - b. los valores límite de emisión que correspondan; o
 - c. en el caso de impactos difusos, los controles, incluidas, cuando proceda, las mejores prácticas medioambientales, establecidos en:
 - la Directiva 96/61/CE del Consejo de 24 de septiembre de 1996 relativa a la prevención y al control integrados de la contaminación;
 - la Directiva 91/271/CE del Consejo, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas ;
 - la Directiva 91/676/CE del Consejo, de 12 de diciembre de 1991, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos utilizados en la agricultura;
 - las directivas adoptadas en virtud del artículo 16 de la presente Directiva (directivas que evalúan el riesgo potencial de las sustancias sobre el hombre y la vida acuática);
 - las directivas enumeradas en el anexo IX (sustancias peligrosas);
 - cualquier otra norma comunitaria pertinente, a más tardar, en el plazo de doce años contados a partir de la entrada en vigor de la presente Directiva, salvo que se especifique otra cosa en la normativa correspondiente.
3. Si un objetivo de calidad o una norma de calidad establecidos en virtud de la presente Directiva, de las directivas enumeradas en el anexo IX o de cualquier otro acto legislativo comunitario exige condiciones más estrictas que las que originaría la aplicación del apartado 2, se establecerán controles de emisión más rigurosos en consecuencia.

Como se puede comprobar, el primer paso siempre es controlar la fuente para el control de las sustancias prioritarias. El siguiente y casi de forma paralela, es fijar normas de calidad ambiental. Posteriormente se desarrolla todo un sistema de control de las sustancias en los vertidos y de análisis del estado de las aguas superficiales (estado ecológico, estado químico) en los cuales se incluyen los programas de seguimiento ambiental, normas de muestreo, determinaciones y análisis para indicadores de calidad, etc. (Anexo V de la Directiva Marco de Agua).

ESTRATEGIAS PARA COMBATIR LA CONTAMINACIÓN DE LAS AGUAS

Para combatir la contaminación de las aguas causada por determinados contaminantes o grupos de contaminantes que representen un riesgo significativo para el medio acuático o a través de él, el Parlamento Europeo y el Consejo deben adoptar medidas específicas las cuales estarán orientadas a reducir progresivamente los vertidos, las emisiones y las pérdidas de los diferentes contaminantes o grupos de contaminantes que especifica en los anexos; y para las sustancias peligrosas prioritarias, interrumpir o suprimir gradualmente tales vertidos, emisiones y pérdidas.

Respecto a las sustancias prioritarias, la Directiva establece que la Comisión debe presentar una propuesta que establezca una lista de sustancias prioritarias que presenten un riesgo significativo para el medio acuático o a través de él, que se determinará mediante:

- a. Una evaluación de los riesgos realizada de conformidad con el Reglamento (CEE) N° 793/93 del Consejo, la Directiva 91/414/CEE del Consejo y la Directiva 98/8/CE del Parlamento Europeo y del Consejo.
- b. Una evaluación específica basada en los riesgos centrada únicamente en la ecotoxicidad acuática y en la toxicidad humana a través del medio acuático.

LISTA INDICATIVA DE LOS PRINCIPALES CONTAMINANTES

La lista de los principales contaminantes que deben reducirse progresivamente en los vertidos, y en las emisiones y las pérdidas, se reflejan en el anexo VIII de la Directiva:

Anexo VIII Lista indicativa de los principales contaminantes

1. Compuestos organohalogenados y sustancias que puedan dar origen a compuestos de esta clase en el medio acuático.
2. Compuestos organofosforados.
3. Compuestos organoestánicos.
4. Sustancias y preparados, o productos derivados de ellos, cuyas propiedades cancerígenas, mutágenas o que puedan afectar al tiroides, esteroideogénica, a la reproducción o a otras funciones endocrinas en el medio acuático o a través del medio acuático estén demostradas.
5. Hidrocarburos persistentes y sustancias orgánicas tóxicas persistentes y bioacumulables.
6. Cianuros.
7. Metales y sus compuestos.
8. Arsénico y sus compuestos.
9. Biocidas y productos fitosanitarios.

SUSTANCIAS PRIORITARIAS

Previamente a la aprobación de la Directiva 2000/60/CE, Marco de Aguas, el control de la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático del territorio de la Unión Europea se fundamentaba en la Directiva 76/464/CEE, de 4 de mayo, la cual aporta los elementos esenciales del sistema de control de la contaminación de las aguas interiores, costeras y territoriales, mediante "directivas subordinadas" independientes que establecen valores límite para las emisiones de sustancias concretas y objetivos de calidad en las aguas afectados por los vertidos de estas sustancias, en orden a llevar un planteamiento combinado en el control de la contaminación. Los controles comunitarios contemplados en la Directiva 76/464/CEE han sido sustituidos, armonizados y desarrollados por la Directiva Marco.

En virtud de la Directiva Marco de Aguas deben adoptarse medidas específicas a nivel comunitario contra la contaminación de las aguas causadas por determinados contaminantes o grupos de contaminantes que representen un riesgo significativo para el medio acuático o a través de él. Estas medidas tienen por objeto la reducción progresiva de los vertidos, las emisiones y las pérdidas, y en el caso de las sustancias prioritarias, la interrupción o supresión gradual de tales vertidos, emisiones y pérdidas en un plazo de veinte años desde su adopción a nivel comunitario, con el objetivo último de conseguir concentraciones en el medio marino cercanas a los valores básicos por lo que se refiere a las sustancias de origen natural, y próximas a cero por lo que respecta a las sustancias sintéticas artificiales.

Una primera estimación de sustancias nocivas realizadas por la Comisión de la CEE condujo a una relación de 130 sustancias en principio candidatas a ser incluidas en la Lista I. Su adscripción definitiva a dicha Lista I sólo se ha realizado en 17 sustancias para las que existe ya una normativa de vertido completa contenida en diversas directivas específicas y unos objetivos de calidad ambiental muy consolidados para aguas continentales, aguas interiores y aguas pertenecientes al mar territorial. Las restantes sustancias, y algunas más añadidas posteriormente a las 130 iniciales, se consideran provisionalmente pertenecientes a la Lista II hasta que se haya decidido expresamente sobre cada una.

LISTA I DE SUSTANCIAS CONTAMINANTES

17 sustancias a las cuales se han definido límites de vertido y objetivos de calidad en aguas

- Mercurio
- Cadmio

Disolventes clorados

- 1,2-dicloroetano
- Cloroformo
- Pentaclorofenol
- Percloroetileno
- Tetracloruro de carbono
- Tricloroetileno

Pesticidas

- Triclorobenceno (TCB)
- Hexaclorobutadieno
- Hexaclorobenceno (HCB)
- Isómeros de hexaclorociclohexano (HCH)
- Aldrín
- Dieldrín
- Isodrín
- Endrín
- Isómeros de DDT

Grupos de sustancias pertenecientes a la Lista I

- Compuestos organohalogenados y sustancias que les pueda dar origen en el medio acuático;
- Compuestos organofosfóricos;
- Compuestos organoestánicos;
- Sustancias de poder cancerígeno demostrado en el medio acuático;
- Mercurio y sus compuestos;
- Cadmio y sus compuestos;
- Aceites minerales persistentes e hidrocarburos petrolíferos;
- Materias sintéticas flotantes o en suspensión.

LISTA II DE SUSTANCIAS CONTAMINANTES

- Sustancias que forman parte de las categorías y grupos de sustancias enumeradas en la relación I para las que no se hayan fijado límites según el artículo 254 del Reglamento.
- Sustancias o tipos de sustancias comprendidos en el siguiente apartado, y que aun teniendo efectos perjudiciales, pueden quedar limitados en zonas concretas según las características de las aguas receptoras y su localización.
- Los metaloides y los metales siguientes y sus compuestos:

| | | | |
|-----------|--------------|-------------|-------------|
| 1. Zinc | 6. Selenio | 11. Estaño | 16. Vanadio |
| 2. Cobre | 7. Arsénico | 12. Bario | 17. Cobalto |
| 3. Níquel | 8. Antimonio | 13. Berilio | 18. Talio |
| 4. Cromo | 9. Molibdeno | 14. Boro | 19. Teluro |
| 5. Plomo | 10. Titanio | 15. Uranio | 20. Plata |
- Biocidas no incluidos en la Lista I;
- Sustancias que transmiten olor y sabor al agua;
- Compuestos organosilícicos persistentes;
- Fósforo y sus compuestos inorgánicos;
- Aceites minerales persistentes;
- Hidrocarburos petrolíferos no persistentes;
- Cianuros y fluoruros;
- Amoníaco y nitritos.

Esta lista publicada en 1976 ha sido estudiada posteriormente para su adaptación, modificación o ampliación a la nueva Directiva Marco. Para ello, el Consejo Europeo en los documentos de propuesta de Directiva previos a la Directiva Marco de Aguas han solicitado a la Comisión la propuesta de una nueva lista de sustancias peligrosas, las cuales se regularán en el futuro mediante la estrategia combinada, es decir, mediante la formulación de normas armonizadas de calidad del agua y controles de emisiones a escala europea.

Esta lista debe basarse en los riesgos para el ecosistema acuático y para la salud humana a través del medio acuático. Para la evaluación de estos riesgos mediante un procedimiento viable y en un periodo de tiempo razonable, se ha definido un procedimiento simplificado de evaluación en función de los riesgos con arreglo a principios científicos (CCM, 2000).

Sobre esta base y en colaboración con una entidad consultora –el Instituto Fraunhofer de Química Mediambiental y Ecotoxicología–, se ha formulado el procedimiento combinado de fijación de prioridades basado en mediciones y modelos denominado COMMPS (Combined Monitoring-Based and Modelling-Based Priority Setting). La idea básica es clasificar de manera automatizada las sustancias de las que existen datos suficientes en función de su riesgo relativo para el medio acuático y aplicar el dictamen de los expertos a la selección final de las sustancias prioritarias (CCE, 2000).

Después de un proceso largo de cálculos, revisiones y evaluaciones por parte de diferentes comités de expertos, se ha aprobado la lista de sustancias prioritarias mediante la Decisión 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo. La lista que se aprueba mediante esta Decisión se corresponde con el Anexo X de la Directiva el cual no fue posible publicarlo en su fecha.

La nueva relación de sustancias prioritarias es la siguiente:

ANEXO X**Lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas**

Alacloro, antraceno, atrazina, benceno, difeniléteres bromados, **cadmio y sus compuestos**, C₁₀₋₁₃-cloroalcanos, clorofeninfos, cloropirifos, **1,2-dicloroetano**, diclorometano, di(2-etilhexil)ftalato (DEHP), diurno, endosulfán (alfa-endosulfán), fluoranteno, **hexaclorobenceno**, **hexaclorobutadieno**, **hexaclorociclohexano (gamma-isómero, lindano)**, isopruturón, plomo y sus compuestos, **mercurio y sus compuestos**, naftaleno, níquel y sus compuestos, nonilfenoles (4-p-nonilfenol), octilfenoles (p-ter-octilfenol), pentaclorobenceno, **pentaclorofenol**, hidrocarburos poliaromáticos (benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(k)fluoranteno, Indeno(1,2,3-cd)pireno), simazina, compuestos del tributiltín (tributiltín catión), **triclorobencenos (1,2,4-triclorobenceno)**, **triclorometano (cloroformo)** y trifluralina.

(en estilo negrita, los compuestos incluidos en la antigua Lista I de sustancias prioritarias)

PROCEDIMIENTO QUE DEBERÁN SEGUIR LOS ESTADOS MIEMBROS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE LAS NORMAS DE CALIDAD QUÍMICA

A la hora de derivar normas de calidad medioambiental para los contaminantes mostrados en el anexo VIII de la Directiva con el fin de proteger la biota acuática, los Estados miembros deben actuar de acuerdo con las disposiciones que se exponen a continuación pudiéndose establecer normas relativas al agua, los sedimentos o la biota.

(...) Si es posible deberán obtenerse datos, tanto puntuales como correspondientes a un período prolongado en el tiempo, respecto de los taxones que se mencionan a continuación y que serán pertinentes para el tipo de masa de agua afectada, así como de otros taxones acuáticos de cuyos datos se disponga. El "conjunto de base" de taxones lo componen:

- Algas y/o macrófitas
- *Daphnia* u organismos representativos de las aguas saladas
- Peces

Establecimiento de las normas de calidad ambiental

Para el establecimiento de la concentración media anual máxima se aplicará el siguiente procedimiento:

- i) Los estados miembros determinarán, en cada caso, factores de seguridad adecuados en consonancia con la naturaleza y calidad de los datos disponibles, con las indicaciones recogidas en el punto 3.3.1. de la parte II del "Documento técnico de orientación en apoyo de la Directiva 93/67/CEE de la Comisión sobre la evaluación del riesgo de las nuevas sustancias notificadas y del Reglamento (CE) No 1488/94 de la Comisión sobre la evaluación del riesgo de las sustancias existentes" y con los factores de seguridad establecidos en la presente Directiva.
- ii) En caso de que se disponga de datos sobre persistencia y bioacumulación, deberán tenerse en cuenta al derivar el valor final de la norma de calidad medioambiental.
- iii) La norma así derivada deberá compararse con las posibles pruebas procedentes de estudios de campo. En caso de que aparezcan anomalías, deberá revisarse la derivación con objeto de calcular un factor de seguridad más preciso.
- iv) La norma resultante deberá someterse a un examen crítico de expertos y a consulta pública con objeto, entre otras cosas, de permitir el cálculo de un factor de seguridad más preciso (...)

4.2. NORMATIVA DE LA COMUNIDAD AUTÓNOMA ANDALUZA REFERENTE A CALIDAD DE AGUAS LITORALES

Las dos normas que surgieron en la Comunidad Autónoma Andaluza a partir de la Ley 7/1994, de 18 de mayo, de Protección Ambiental (BOJA, 1994) fueron las siguientes:

DECRETO 14/1996, de 16 de enero, por el que se aprueba el Reglamento de la calidad de las aguas litorales (BOJA, 1996).

ORDEN de 14 de febrero de 1997, por la que se clasifican las aguas litorales andaluzas y se establecen los objetivos de calidad de las aguas afectadas directamente por los vertidos, en desarrollo del Decreto 14/1996, de 16 de enero, por el que se aprueba el Reglamento de calidad de las aguas litorales (BOJA, 1997).

El Decreto 14/1996 aprueba el *Reglamento de la calidad de las aguas litorales* en el que se incluyen las disposiciones necesarias para garantizar la plena efectividad de las previsiones contenidas en el Capítulo III del Título III de la Ley de Protección Ambiental, concretando las normas básicas establecidas en la legislación estatal de costas.

El Reglamento de la calidad de las aguas litorales se estructura en cinco capítulos relativos a disposiciones generales, régimen de las autorizaciones de vertidos, comprobación, vigilancia y control, objetivos de calidad, y canon y fianza, completándose con tres anexos que recogen las tablas de límites para vertidos y métodos de análisis, los valores del coeficiente *K* para el cálculo del canon de vertido y las normas para su estimación en las industrias que utilizan el agua como refrigeración.

En relación a las aguas litorales, establece una clasificación en *aguas especiales*, *aguas limitadas*, *aguas normales*, y *aguas menos limitadas*. Con esta clasificación se pretende establecer distintos grados de protección de las aguas litorales, en función de sus condiciones hidrodinámicas y su valor ambiental, de forma que al establecer los objetivos de calidad de las aguas para cada una de ellas, se reflejen estos diferentes grados de protección.

La definición de estas aguas se muestra en el apartado siguiente.

La Orden de 14 de febrero de 1997 establece una clasificación de las aguas litorales andaluzas con arreglo a las exigencias y limitaciones de vertidos establecidas en las normas comunitarias y en el ordenamiento español. De esta forma, se pretende realizar un control efectivo de la calidad de las aguas andaluzas estableciendo los objetivos de calidad de las aguas para un número determinado de parámetros y en orden a la clasificación establecida de las aguas litorales. Además establece las directrices que debe seguir el *plan de vigilancia y control* de los medios receptores afectados directamente por los vertidos. Es de resaltar que esta Orden fue elaborada en colaboración con el grupo de investigación de Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Cádiz.

Dicha orden recoge dos anexos en los cuales se define la siguiente información:

- I. Clasificación de las aguas litorales andaluzas
- II. Objetivos de calidad

Los tipos de agua en los cuales se clasifica el litoral andaluz se muestra en el apartado siguiente.

Respecto a los objetivos de calidad, esta normativa regula la siguiente relación de parámetros, estableciendo para cada uno de ellos valores imperativos que no se deben sobrepasar en un medio receptor afectado por vertidos:

- A. Parámetros físico-químicos: Coloración, Transparencia, pH, Sólidos en suspensión, Oxígeno disuelto, Carbono orgánico total, Nitratos, Hidrocarburos no polares, Aceites y grasas, Detergentes, Fenoles, Salinidad.
- B. Sustancias peligrosas: Cianuros libres, Fluoruro, Amonio, Nitritos, Fósforo total, Arsénico, Cadmio, Cobre, Cromo total, Cromo VI, Estaño, Mercurio total, Níquel, Plomo, Selenio, Titanio, Zinc, Hexaclorociclohexano, Tetracloruro de carbono, DDTs, Pentaclorofenoles, Aldrín y derivados, Cloroformo, Hexaclorobenceno, Hexaclorobutadieno, 1,2-dicloroetano, Tricloroetileno, Percloroetileno, Triclorobenceno, Otros plaguicidas u productos similares, Tributilestaño, Hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Los objetivos de calidad determinados para cada uno de estos parámetros en los cuatro tipos de agua, se muestran en el Capítulo II del presente documento.

4.3. CLASIFICACIÓN DE LAS ÁREAS AMBIENTALES SEGÚN DIFERENTES NORMAS

Existen varias normas a nivel comunitario, nacional y autonómico que clasifican el litoral andaluz en función de varios criterios fundamentados por los objetivos de cada una de estas normativas.

La Directiva 91/271/CEE, de 21 de mayo, sobre tratamiento de aguas residuales urbanas (DOCE, 1991) y las diferentes transposiciones a la normativa nacional (Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, y por el Real Decreto 509/1996, de 15 de marzo), contempla los vertidos de estas aguas finalmente en el mar, desde tres supuestos distintos: normal cuando el tratamiento impuesto es común a los vertidos fluviales, más riguroso si se trata de zonas sensibles y menos exigentes si por el contrario las aguas marinas de destino son consideradas menos sensibles. La definición de estas zonas se realiza tanto para el medio continental como para el medio marino. Para el medio marino se consideran zonas sensibles y menos sensibles a las siguientes:

Zonas sensibles.

Se considerará que un medio acuático es zona sensible si puede incluirse en uno de los siguientes grupos:

Los estuarios y aguas costeras que sean eutróficos o que podrían llegar a ser eutróficos en un futuro próximo si no se adoptan medidas de protección.

Estuarios, bahías y otras aguas costeras que tengan un intercambio de aguas escaso o que reciban gran cantidad de nutrientes. Los vertidos de aglomeraciones pequeñas tienen normalmente poca importancia en dichas zonas, pero para las grandes aglomeraciones deberá incluirse la eliminación de fósforo y/o nitrógeno a menos que se demuestre que su eliminación no tendrá consecuencias sobre el nivel de eutrofización.

Zonas menos sensibles

Un medio o zona de agua marina podrá catalogarse como zona menos sensible cuando el vertido de aguas residuales no tenga efectos negativos sobre el medio ambiente debido a la morfología, hidrología o condiciones hidráulicas específicas de esa zona.

Al determinar las zonas menos sensibles, los Estados miembros tomarán en consideración el riesgo de que la carga vertida pueda desplazarse a zonas adyacentes y ser perjudicial para el medio ambiente. Los estados miembros reconocerán la existencia de zonas sensibles fuera de su jurisdicción nacional.

Para determinar las zonas menos sensibles se tendrán en cuenta los siguientes elementos: bahías abiertas, estuarios y otras aguas costeras con un intercambio de aguas bueno y que no tengan eutrofización o agotamiento de oxígeno, o en las que se

considere que es improbable que lleguen a desarrollarse fenómenos de eutrofización o de agotamiento de oxígeno por el vertido de aguas residuales urbanas.

Como se ha comentado en el apartado anterior, las aguas litorales andaluzas se clasifican en función de cuatro tipos de aguas las cuales quedarán definidas por las siguientes definiciones (BOJA, 1996; BOJA, 1997):

Aguas especiales

Aquellas caracterizadas por sus singulares condiciones ambientales, bien en su vertiente de aguas de acusado valor estético o aguas litorales con destacado valor ecológico o paisajístico y aquellas aguas donde se reconozca la importancia de su conservación, como es el caso de las reservas naturales.

Aguas limitadas

Aguas de estuarios, bahías o aquellas en donde debido a condiciones de escasa renovación y/o a la cantidad de sustancias contaminantes y/o nutrientes que reciben, se puedan dar fenómenos de eutrofización, acumulación de sustancias tóxicas o cualquier otro fenómeno que incida negativamente en las condiciones naturales del medio y reduzcan sus posibilidades de uso.

Aguas normales

Aguas litorales distintas de las de estuarios; bahías abiertas o aquéllas en donde debido a sus condiciones de renovación y/o a la cantidad de sustancias contaminantes que reciben, puedan verse menos afectadas por los fenómenos antes mencionados, no previéndose efectos negativos sobre las mismas y sus usos.

Aguas menos limitadas

Aguas de mar territorial o aquéllas con un intercambio bueno o en las que se considere que es altamente improbable que lleguen a desarrollarse fenómenos que afecten a las mismas y a sus usos.

A partir de estas definiciones, la Orden de 14 de febrero de 1997 clasifica el litoral andaluz distinguiendo 6 zonas:

1. *Litoral Atlántico* (Desde desembocadura del Guadiana hasta Cabo de Trafalgar): AGUAS NORMALES
2. *Canal del Padre Santo* (Desde faro Espigón Juan Carlos I hasta la Punta del Sebo (confluencia Ríos Tinto y Odiel)): AGUAS NORMALES
3. *Ríos Tinto y Odiel* (Desde la Punta del Sebo hasta donde llega la influencia mareal (Niebla y Gibraleón)): AGUAS LIMITADAS
4. *Río Guadalquivir* (Desde Sanlúcar de Barrameda hasta Presa de Alcalá): AGUAS LIMITADAS
5. *Bahía de Cádiz* (Desde Bajo de las Cabezuelas hasta Punta San Felipe (Cádiz)): AGUAS LIMITADAS
6. *Litoral Mediterráneo* (Desde Cabo de Trafalgar hasta límite con Murcia): AGUAS NORMALES

Las aguas interiores según esta normativa quedarían incluidas dentro de la clasificación de aguas limitadas, y la región más externa del mar territorial como aguas menos limitadas.

Con la entrada en vigor de dicha norma, Andalucía se convirtió en 1996 en la primera comunidad autónoma en fijar límites legales al vertido de aguas residuales y en establecer un canon de vertido proporcional al daño ambiental causado, lo que permite exigir a las industrias la reducción de sus cargas contaminantes.

Mediante el Decreto 54/1999, de 2 de marzo, se declaran las distintas zonas sensibles, menos sensibles y normales en las aguas del litoral andaluz y de las cuencas hidrográficas intracomunitarias (con la totalidad de su territorio dentro de la comunidad autónoma). Este decreto aplica en Andalucía el mandato de las normativas estatal y europea sobre tratamiento de aguas residuales urbanas y clasificación por zonas de las aguas receptoras de vertidos, y además, es coherente con la legislación autonómica sobre aguas litorales.

La norma califica como zonas sensibles las áreas acuáticas del Paraje Natural de las Marismas del Odiel (Huelva), del Parque Natural de la Bahía de Cádiz y de las lagunas litorales de los ríos Aguas y Antas (Almería), además de los embalses de Guadalhorce-Guadalteba (Málaga), Beas (Huelva) y los Hurones (Cádiz).

En cuanto a las zonas menos sensibles, el decreto cataloga como tales a las comprendidas en una franja marina que discurre a lo largo de todo el litoral andaluz y cuya anchura varía según los dos tramos que se establecen. En el primero de ellos, entre el Cabo de Trafalgar y la desembocadura del Guadiana, la franja abarca desde las 12 millas del mar territorial hasta una línea situada a una milla de la bajamar. En el segundo tramo, entre Trafalgar y el límite con la Comunidad de Murcia, la delimitación se amplía hasta media milla de la bajamar.

CONSIDERACIONES RESPECTO A LA DIRECTIVA MARCO DE AGUAS EN CUANTO A ZONAS PROTEGIDAS

La Directiva Marco de Aguas también hace una consideración especial en aquellas áreas de especial interés y que por tanto tengan alguna figura de protección o hayan sido clasificadas en orden a proteger la salud de las personas o de la vida acuática.

En su texto, concretamente en el artículo 6, la Directiva Marco establece la necesidad de que los Estados miembros establezcan un registro de todas las zonas incluidas en cada demarcación hidrográfica que hayan sido declaradas objeto de una protección especial en virtud de una norma comunitaria específica. El registro de zonas protegidas previsto en el artículo 6 incluirá los siguientes tipos de zonas protegidas:

- Zonas designadas para la captación de agua destinada al consumo humano
- Zonas designadas para la protección de especies acuáticas significativas desde un punto de vista económico
- Masas de agua declaradas de uso recreativo, incluidas las zonas declaradas aguas de baño
- Zonas sensibles en lo que a nutrientes respecta
- Zonas declaradas sensibles en el marco de la Directiva 91/271/CEE
- Zonas designadas para la protección de hábitats o especies cuando el mantenimiento o la mejora del estado de las aguas constituya un factor importante de su protección

El resumen del registro requerido como parte del plan hidrológico de cuenca incluirá mapas indicativos de la ubicación de cada zona protegida y una descripción de la legislación comunitaria, nacional o local con arreglo a la cual han sido designadas.

Este catálogo debe realizarse en un plazo de cuatro años desde la aprobación de la Directiva, por tanto, aún está en proceso de elaboración. Una vez aprobado, las diferentes zonificaciones realizadas en función de *zonas sensibles* y *menos sensibles* serán sustituidas por las incluidas en el nuevo catálogo.

5. CONSIDERACIONES PREVIAS RELATIVAS A LA SELECCIÓN DE VARIABLES

En el apartado 2 del presente capítulo se detalló la estructura seguida en este documento. Antes de finalizar este capítulo, es conveniente realizar una serie de consideraciones previas relativas a la selección de las principales variables de este estudio las cuales han sido:

- ☑ Las áreas de estudio seleccionadas
- ☑ Los compuestos específicos para la realización de los ensayos de toxicidad
- ☑ Las especies de ensayo de las pruebas de toxicidad.

5.1. CONSIDERACIONES RESPECTO A LAS ÁREAS DE ESTUDIO

A lo largo del estudio realizado en estos años sobre las diferentes estrategias seguidas por los países u organizaciones internacionales para abordar la contaminación de las aguas marinas y el diseño de objetivos de calidad ambiental, se ha observado que, una vez que se han cubierto unos mínimos en el desarrollo de estas materias, la investigación y las normativas se focalizan hacia particularidades. En términos de criterios de calidad de aguas, una vez que se han definido criterios globales para todas las aguas, se pasan a estudiar y determinar criterios particulares en cada cuerpo de agua.

Las diferentes normas comunitarias, nacionales y autonómicas en materia de calidad de aguas y vertidos al litoral proporcionan esta protección global. Sin embargo, es preciso comenzar con el estudio de las particularidades, y consciente de eso, la nueva Directiva Marco de Aguas plantea en su texto la posibilidad de que así sea, tanto en el sentido de aumentar los criterios de protección en aquellos sistemas de alto nivel de calidad ambiental, como en el de ser más flexibles en aquellos casos en los que la degradación ambiental es tal que los esfuerzos económicos y científicos para su recuperación no sean viables.

En este trabajo se ha pretendido analizar estas particularidades en cuatro áreas del litoral de Cádiz y Huelva y comprobar con estos estudios que es preciso abarcar las peculiaridades de cada área litoral, o al menos de aquellas que pueden ser más problemáticas, esto es, las definidas como *zonas sensibles o aguas limitadas*.

Las áreas comprendidas en este estudio se corresponden con las aguas de la **Ría de Huelva, Bahía de Cádiz**, la zona de marismas del **Río Iro**, y la **Bahía de Algeciras**. En principio puede pensarse que estamos dejando fuera de este estudio zonas muy importantes desde el punto de vista del transporte de contaminantes al mar tales como grandes o pequeños estuarios. ¿Por qué se han seleccionado estas zonas y no otras?. En este sentido hay que especificar que la selección se ha centrado fundamentalmente en zonas estudiadas mediante financiación a través de diversos convenios de colaboración entre la Universidad de Cádiz y diferentes organismos tales como la Consejería de Medio Ambiente (Ría de Huelva y Bahía de Cádiz), Ayuntamientos (Río Iro) y/o empresas privadas (Bahía de Algeciras). Algunos de estos convenios están vigentes en la actualidad bien manteniendo el área de estudio, bien cambiando el escenario a otras áreas litorales.

Antes de finalizar este apartado, hay que puntualizar una cuestión respecto a la clasificación de estas áreas ambientales según la normativa andaluza (Orden de 14 de febrero de 1997, BOJA nº 27, de 4 de marzo). Si bien por su morfología e hidrología todas ellas podrían clasificarse como *aguas limitadas*, la realidad es que algunas de ellas en su totalidad, o incluso una parte importante del área de estudio de otras, se clasifican como *aguas normales*. En algunas de las discusiones que se hacen en este documento, sobre todo en aquellas en las que se analiza la viabilidad de los actuales objetivos de calidad, no se ha distinguido entre ambas zonas, y por tanto, se ha realizado el análisis en función de las dos categorías.

5.2. CONSIDERACIONES RESPECTO A LOS COMPUESTOS ESPECÍFICOS UTILIZADOS EN LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD

De las revisiones realizadas acerca de las sustancias incluidas en las diferentes normas relativas al control de vertidos y objetivos de calidad y la nueva lista de sustancias prioritarias, se han seleccionado un conjunto de compuestos químicos al objeto de aplicar los procedimientos de ensayos de toxicidad con especies residentes en el litoral andaluz.

Se han seleccionado dos tensioactivos, el tensioactivo aniónico lineal alquil benceno sulfonato sódico (**LAS**) y el tensioactivo no-aniónico nonilfenol nonietoxilado (**NP9EO**). El LAS es el tensioactivo de mayor producción y consumo mundial (Granados, 1996), por tanto, es uno de los compuestos que presenta un mayor volumen de estudios de toxicidad. Al ser un producto sintético utilizado en numerosas formulaciones detergentes, tradicionalmente se ha considerado al LAS como indicador de la presencia de aguas residuales en el medio ambiente. Por tanto, es uno de los compuestos que se contempla en las legislaciones relativas a calidad de aguas (aguas de baño, aguas litorales andaluzas afectadas por vertidos). Los nonilfenoles etoxilados son tensioactivos no-iónicos de amplio uso en diferentes procesos industriales. Hasta ahora la legislación europea no había considerado a estos compuestos dentro de su lista prioritaria de sustancias. Sin embargo, las diferentes propuestas de lista de sustancias prioritarias consideraron la inclusión de los nonilfenoles etoxilados como candidatos a pertenecer a la lista de sustancias prioritarias en el marco de la política de aguas. En la lista definitiva aprobada en diciembre de 2001 se incluyen a los nonilfenoles, 4-para-nonilfenol, octilfenoles y para-ter-octilfenol, dejando fuera de la lista a los compuestos etoxilados. Sin embargo, éstos se mantienen como candidatos a pertenecer a esta lista en los próximos años.

La selección de ambos compuestos no sólo está justificada desde un punto de vista normativo. En la actualidad, el grupo de investigación de Tecnología del Medio Ambiente de la Universidad de Cádiz mantiene una línea de investigación relativa a la biodegradación de estos compuestos en el medio marino.

Otro compuesto seleccionado es el **fenol**. Este es uno de los compuestos "clásicos" en las normativas de calidad de aguas (aguas de moluscos, aguas litorales andaluzas). Evidentemente existe una gran diversidad de compuestos fenólicos de amplio uso industrial. Con el término de índice de fenoles se suele incluir a todos estos compuestos, siendo el fenol el compuesto de referencia dentro de este grupo.

Dentro del conjunto de sustancias pesticidas organoclorados, el hexaclorociclohexano, y más concretamente, el isómero γ (**lindano**) ha tenido un tratamiento particular en la normativa europea debido a la peligrosidad que representa este compuesto para la vida acuática. La selección de este compuesto no sólo está motivada porque sea una de las sustancias prioritarias sino también por eventos de contaminación y mortalidad de especies acuáticas relacionadas con este compuestos durante la ejecución del convenio para la "*evaluación de procesos ecotoxicológicos en especies acuáticas del litoral andaluz*".

En las diferentes legislaciones relativas a calidad de aguas siempre se ha incluido a un extenso número de metales como parámetros de control de la contaminación de las aguas. De estos metales, el **cadmio** y sus compuestos han tenido además un tratamiento especial como sustancia prioritaria debido a su peligrosidad para el medio acuático. Por tanto la selección de este compuesto está perfectamente justificada en este trabajo. El **cobre** y el **zinc** no están considerados como sustancias prioritarias, pero hasta la publicación de la nueva lista de sustancias prioritarias en diciembre de 2001, un grupo de 20 metales y metaloides formaban parte de la lista II de sustancias peligrosas. Entre estos metales, por supuesto, se encuentran el cobre y el zinc.

5.3. CONSIDERACIONES RESPECTO A LAS ESPECIES ENSAYADAS

La selección del tipo de pruebas de toxicidad ejecutadas y las especies de ensayo se realizó durante el convenio para la "*evaluación de procesos ecotoxicológicos en especies acuáticas del litoral andaluz*". Uno de los objetivos de este Convenio fue la selección de pruebas de toxicidad rápidas de detección de eventos contaminantes en el medio marino. En función del término "rápido", la primera elección fue el ensayo de inhibición de fotobacterias mediante el sistema LUMISTOX. Los resultados obtenidos aplicando este ensayo a muestras ambientales no proporcionaron datos concluyentes en aguas, posiblemente por la baja toxicidad de las muestras ensayadas. Por esta razón se buscaron otras alternativas con diferentes grupos animales, diferentes periodos de exposición y diferentes respuestas: ensayos de toxicidad agudo y crónicos en peces y moluscos, ensayos de toxicidad aguda con microcrustáceos y ensayos de inhibición del crecimiento con microalgas. Estos ensayos se aplicarían a muestras ambientales y a compuestos específicos. Los resultados obtenidos permitieron concluir que los ensayos con **microalgas marinas** y **Artemia salina** fueron los más rápidos (< 72 h), y con relaciones dosis-respuesta más claras. Los ensayos con moluscos y peces permitieron obtener resultados significativos fundamentalmente a nivel histológico, sin embargo, debido al gran equipamiento que requieren, aclimatación de los organismos, control de condiciones ambientales de las instalaciones, y complejidad de los análisis histológicos, se rechazaron como ensayos "rápidos" para la elaboración de normas de calidad ambiental en función de los resultados toxicológicos con estos organismos. Finalmente se decidió incluir también el test con **fotobacterias** para que sirviera de referencia por estar estandarizado.

CAPÍTULO II

CALIDAD FÍSICO-QUÍMICA DE LAS ÁREAS DE ESTUDIO

Resumen

En este capítulo se realiza una evaluación y clasificación del estado actual de calidad ambiental de cuatro áreas litorales del Golfo de Cádiz. Para ello, se han abordado las siguientes etapas:

- Puesta a punto de diversas técnicas de análisis de muestras de agua de mar
- Ejecución de diferentes campañas de muestreo en cada una de las áreas de estudio
- Análisis de las muestras
- Selección y aplicación de diferentes técnicas de análisis de datos
- Selección y aplicación de índices de calidad ambiental

Objetivos

Los objetivos que se pretenden cumplir con la elaboración de este capítulo son los siguientes:

- Realizar una caracterización completa de las aguas de mar de las zonas objeto de estudio, basada en los parámetros rutinarios de control de aguas marinas.
- Utilizar diversas técnicas de análisis de datos con objeto de establecer tendencias y relaciones entre los parámetros físico-químicos, y clasificar las zonas de estudio en función del estado de calidad ambiental
- Aplicar diferentes índices de calidad ambiental al objeto de clasificar las áreas de estudio desde el punto de vista físico-químico.

ÍNDICE DEL CAPÍTULO II

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. ANTECEDENTES..... | 3 |
| 2.1. CONTROL DE LA CALIDAD AMBIENTAL DE AGUAS MARINAS | 3 |
| 2.1.1. PARÁMETROS INDICADORES DE CALIDAD AMBIENTAL..... | 3 |
| 2.1.2. OBJETIVOS DE CALIDAD..... | 5 |
| 2.2. ÍNDICES DE CALIDAD AMBIENTAL | 6 |
| 2.2.1. USOS DE LOS ÍNDICES DE CALIDAD AMBIENTAL..... | 6 |
| 2.2.2. DISEÑO DE LOS ÍNDICES DE CALIDAD AMBIENTAL..... | 7 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS | 11 |
| 3.1. ZONAS DE ESTUDIO..... | 11 |
| 3.1.1. RÍA DE HUELVA | 13 |
| 3.1.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO..... | 13 |
| 3.1.1.2. NÚCLEOS URBANOS, VERTIDOS CATALOGADOS, ZONAS PROTEGIDAS..... | 13 |
| 3.1.1.3. ESTACIONES DE MUESTREO..... | 15 |
| 3.1.1.4. PLANIFICACIÓN Y TOMA DE MUESTRA EN LA RÍA DE HUELVA | 16 |
| 3.1.2. BAHÍA DE CÁDIZ..... | 19 |
| 3.1.2.1. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO..... | 19 |
| 3.1.2.2. NÚCLEOS URBANOS, VERTIDOS CATALOGADOS, ZONAS PROTEGIDAS..... | 19 |
| 3.1.2.3. ESTACIONES DE MUESTREO..... | 21 |
| 3.1.2.4. PLANIFICACIÓN Y TOMA DE MUESTRA EN LA BAHÍA DE CÁDIZ..... | 22 |
| 3.1.3. ESTUARIO DEL RÍO IRO..... | 25 |
| 3.1.3.1. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO..... | 25 |
| 3.1.3.2. NÚCLEOS URBANOS, VERTIDOS CATALOGADOS, ZONAS PROTEGIDAS..... | 25 |
| 3.1.3.3. ESTACIONES DE MUESTREO..... | 26 |
| 3.1.3.4. PLANIFICACIÓN Y TOMA DE MUESTRA EN EL RÍO IRO..... | 28 |
| 3.1.4. BAHÍA DE ALGECIRAS..... | 29 |
| 3.1.4.1. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO..... | 29 |
| 3.1.4.2. NÚCLEOS URBANOS, VERTIDOS CATALOGADOS, ZONAS PROTEGIDAS..... | 29 |
| 3.1.4.3. ESTACIONES DE MUESTREO..... | 30 |
| 3.1.4.4. PLANIFICACIÓN Y TOMA DE MUESTRA EN LA BAHÍA DE ALGECIRAS..... | 32 |
| 3.2. SELECCIÓN DE PARÁMETROS DE VIGILANCIA AMBIENTAL..... | 34 |
| 3.3. METODOS DE ANÁLISIS..... | 35 |
| 3.4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE DATOS..... | 36 |
| 3.4.1. EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL CONJUNTO DE DATOS | 36 |
| 3.4.1.1. CÁLCULO DE CANTIDADES ESTADÍSTICAS BÁSICAS | 37 |
| 3.4.1.1.1. MEDIDAS DE VALIDEZ RELATIVA..... | 37 |
| 3.4.1.1.2. MEDIDAS DE TENDENCIA CENTRAL..... | 37 |
| 3.4.1.1.3. MEDIDAS DE DISPERSIÓN | 37 |
| 3.4.1.2. REPRESENTACIONES GRÁFICAS DE LOS DATOS..... | 38 |
| 3.4.1.2.1. HISTOGRAMAS | 38 |
| 3.4.1.2.2. DIAGRAMAS DE DATOS ORDENADOS | 39 |
| 3.4.1.2.3. DIAGRAMAS DE BOX-WHISKERS | 39 |
| 3.4.2. MEDIDAS DE ASOCIACIÓN DEL CONJUNTO DE DATOS | 40 |
| 3.4.2.1. MATRICES DE CORRELACIÓN | 40 |
| 3.4.2.2. ANÁLISIS CLUSTER..... | 41 |
| 3.4.2.3. ANÁLISIS FACTORIAL Y ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES..... | 42 |
| 3.4.3. ESTANDARIZACIÓN DE LAS VARIABLES | 43 |
| 3.4.4. RESUMEN DE TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE DATOS | 43 |
| 3.5. DEFINICIÓN DE LOS ÍNDICES DE CALIDAD AMBIENTAL | 45 |
| 3.5.1. ÍNDICE RESPECTO A LA ESTACIÓN DE REFERENCIA | 45 |
| 3.5.2. ÍNDICE RESPECTO A LOS VALORES MÁXIMOS O ÍNDICE DE CONTAMINACIÓN | 46 |
| 3.5.3. CONSIDERACIONES PREVIAS AL CÁLCULO DE LOS ÍNDICES | 46 |

| | |
|---|-----|
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 49 |
| 4.1. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA RÍA DE HUELVA | 49 |
| 4.1.1. RESULTADOS PROMEDIO OBTENIDOS EN LAS ESTACIONES DE MUESTREO | 49 |
| 4.1.2. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS TRANSECTOS DE LA RÍA DE HUELVA | 55 |
| 4.1.3. HISTOGRAMAS DE FRECUENCIAS. DIAGRAMAS DE DATOS ORDENADOS. DIAGRAMAS DE BOX-WHISKERS | 59 |
| 4.1.4. MATRIZ DE CORRELACIÓN. ANÁLISIS CLUSTER. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES | 75 |
| 4.1.4.1. MATRIZ DE CORRELACIÓN | 75 |
| 4.1.4.2. ANÁLISIS CLUSTER | 78 |
| 4.1.4.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES | 82 |
| 4.2. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA BAHÍA DE CÁDIZ | 85 |
| 4.2.1. RESULTADOS PROMEDIO OBTENIDOS EN LAS ESTACIONES DE MUESTREO | 85 |
| 4.2.2. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS TRANSECTOS DE LA BAHÍA DE CÁDIZ | 91 |
| 4.2.3. HISTOGRAMAS DE FRECUENCIAS. DIAGRAMAS DE DATOS ORDENADOS. DIAGRAMAS DE BOX-WHISKERS | 95 |
| 4.2.4. MATRIZ DE CORRELACIÓN. ANÁLISIS CLUSTER. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES | 112 |
| 4.2.4.1. MATRIZ DE CORRELACIÓN | 112 |
| 4.2.4.2. ANÁLISIS CLUSTER | 114 |
| 4.2.4.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES | 118 |
| 4.3. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUARIO DEL RÍO IRO | 123 |
| 4.3.1. RESULTADOS PROMEDIO OBTENIDOS EN LAS ESTACIONES DE MUESTREO | 123 |
| 4.3.2. ESTUDIO ESTADÍSTICO DEL ESTUARIO DEL RÍO IRO | 125 |
| 4.3.3. HISTOGRAMAS DE FRECUENCIAS. DIAGRAMAS DE DATOS ORDENADOS. DIAGRAMAS DE BOX-WHISKERS | 127 |
| 4.3.4. MATRIZ DE CORRELACIÓN. ANÁLISIS CLUSTER. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES | 137 |
| 4.3.4.1. MATRIZ DE CORRELACIÓN | 137 |
| 4.3.4.2. ANÁLISIS CLUSTER | 139 |
| 4.3.4.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES | 142 |
| 4.4. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA BAHÍA DE ALGECIRAS | 145 |
| 4.4.1. RESULTADOS PROMEDIO OBTENIDOS EN LAS ESTACIONES DE MUESTREO | 145 |
| 4.4.2. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS TRANSECTOS DE LA BAHÍA DE ALGECIRAS | 150 |
| 4.4.3. HISTOGRAMAS DE FRECUENCIAS. DIAGRAMAS DE DATOS ORDENADOS. DIAGRAMAS DE BOX-WHISKERS | 153 |
| 4.4.4. MATRIZ DE CORRELACIÓN. ANÁLISIS CLUSTER. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES | 164 |
| 4.4.4.1. MATRIZ DE CORRELACIÓN | 164 |
| 4.4.4.2. ANÁLISIS CLUSTER | 166 |
| 4.4.4.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES | 170 |
| 4.5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ZONAS AMBIENTALES DE ESTUDIO | 173 |
| 4.5.1. DIAGRAMAS DE DATOS ORDENADOS. DIAGRAMAS DE BOX-WHISKERS | 173 |
| 4.5.2. ANÁLISIS CLUSTER | 185 |
| 4.6. ÍNDICES DE CALIDAD AMBIENTAL | 189 |
| 4.6.1. ÍNDICES DE CALIDAD EN LA RÍA DE HUELVA | 189 |
| 4.6.2. ÍNDICES DE CALIDAD EN LA BAHÍA DE CÁDIZ | 192 |
| 4.6.3. ÍNDICES DE CALIDAD EN EL RÍO IRO | 195 |
| 4.6.4. ÍNDICES DE CALIDAD EN LA BAHÍA DE ALGECIRAS | 198 |
| 4.6.5. ÍNDICES DE CALIDAD EN EL GOLFO DE CÁDIZ | 200 |
| 5. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES DEL CAPÍTULO II | 205 |
| 5.1. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES RESPECTO A LAS HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS | 205 |
| 5.2. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES RESPECTO A LAS ÁREAS LITORALES ESTUDIADAS | 207 |

1. INTRODUCCIÓN

En el medio marino, las zonas costeras son las que presentan un mayor riesgo de sufrir problemas de contaminación y de deterioro ambiental debido al impacto de la actividad humana. En la actualidad, todas las poblaciones de más de 15000 habitantes-equivalentes deben de depurar sus aguas residuales, y a finales del año 2005 estarán obligadas todas las poblaciones superiores a 2000 habitantes-equivalentes (Real Decreto-Ley 11/1995, BOE nº312, de 30 de diciembre de 1995). Sin embargo, los objetivos que se marcan en esta normativa, todavía no se cumple en muchos casos debido principalmente a razones técnicas o políticas. La realidad es que algunos municipios vierten un volumen importante de aguas residuales a las zonas costeras bien de carácter bruto o bien con un deficiente grado de depuración por mal funcionamiento de las estaciones depuradoras.

En el caso de los vertidos industriales, estos están sometidos a normativas específicas dependiendo de la composición del efluente y de las autorizaciones concedidas por parte de las autoridades competentes. En el caso de Andalucía, los vertidos industriales al medio marino están regulados mediante normativa autonómica (Decreto 14/1996, BOJA nº 19, de 8 de febrero de 1996).

En la actualidad, se está finalizando la construcción de algunas estaciones de tratamiento de aguas residuales y poniendo en marcha otras, o bien renovando las tecnologías de aquellas que quedaron obsoletas. Por tanto, nos encontramos en un momento en el que se debe producir un punto de inflexión para que los ecosistemas acuáticos reflejen una cierta mejora en la calidad ambiental de sus aguas. Tampoco hay que olvidar que aunque la contaminación en aguas costeras por aguas residuales debe ir disminuyendo, siempre existen otras fuentes de contaminación puntuales y/o difusas que afectan en general a la calidad ambiental de todos los recursos hídricos, (p.e. contaminación de nitratos lavados del terreno por escorrentías agrícolas).

Todo ello hace que actualmente sea especialmente interesante la realización de estudios de calidad ambiental de los ecosistemas litorales con el objeto de obtener una diagnosis ambiental, así como realizar una revisión de los objetivos de calidad vigentes para adecuarlos al estado de la calidad presente y de las perspectivas de calidad futuras a corto y medio plazo.

Para la realización de estos estudios es fundamental una selección adecuada tanto de las áreas ambientales más problemáticas (desde el punto de vista de la acumulación de contaminantes, fenómenos de eutrofización, etc.), así como de los parámetros incluidos en los programas de seguimiento ambiental.

A la hora de seleccionar una o varias áreas ambientales de estudio, hay que tener en cuenta especialmente aquellas que por sus características morfológicas, hidrodinámicas y/o ecológicas sean más interesantes de estudiar. Generalmente las zonas más interesantes y sobre las que se suelen centrar los estudios son los estuarios, bahías y marismas. Estos tres tipos de ambientes presentan una circulación restringida de sus aguas y por tanto, ante cualquier suceso de contaminación, bien sea puntual o crónico, se va a ver más afectado que un sistema de aguas abiertas en el que pueda existir una alta dilución. Desde un punto de vista ecológico, al ser aguas más abrigadas suelen ser zonas de criadero y/o de protección de gran número de especies acuáticas muchas de ellas de interés comercial o ecológico.

Estos estudios realizados en aguas costeras, y en general en todo cuerpo de agua, incluyen un gran número de parámetros físico-químicos de análisis rutinario (parámetros *in situ*, y nutrientes fundamentalmente), y otros parámetros de determinación más compleja y por tanto menos frecuente (metales pesados, compuestos orgánicos, pigmentos fotosintéticos, etc).

No hay que olvidar que el interés por la realización de estos estudios no está motivada exclusivamente por razones científicas. En el *Capítulo I* de la presente memoria, se analizaron las tendencias actuales desde el punto de vista legislativo en materia de aguas. La nueva *Directiva 60/2000/CE Marco de Aguas*,

establece en su *artículo 8* relativo al "*seguimiento del estado de las aguas superficiales, subterráneas y de las zonas protegidas*" la obligatoriedad de establecer programas de seguimiento ambiental con objeto de tener una visión coherente y completa del estado ecológico y químico de las aguas. Se debe recordar también que esta Directiva demanda que se tenga un control especial en aquellos sistemas acuáticos con una circulación de aguas limitadas y de los sistemas costeros, puesto que en la gran mayoría de los casos suelen darse dos sucesos:

- ✓ La calidad de sus aguas depende en gran medida de la calidad de las aguas continentales que fluyen hacia ellas.
- ✓ La protección del estado de calidad de esta agua proporciona beneficios económicos puesto que contribuye a la protección de las poblaciones piscícolas en general, y las de aquellas que tienen su hábitat cerca de las costas en particular.

Así pues, este Capítulo II tiene por objeto fundamental **evaluar el estado de calidad ambiental de diferentes áreas ambientales localizadas en la costa de Huelva y Cádiz**. Para una mejor y completa evaluación se han utilizado dos herramientas fundamentales:

- ✗ Herramientas estadísticas y de análisis de datos, e
- ✗ Índices de calidad ambiental formulados a partir de los resultados físico-químicos.

2. ANTECEDENTES

2.1. CONTROL DE LA CALIDAD AMBIENTAL DE AGUAS MARINAS

2.1.1. PARÁMETROS INDICADORES DE CALIDAD AMBIENTAL

La forma más sencilla y tradicional de evaluar la calidad del agua es mediante el análisis sistemático de un conjunto limitado de variables físico-químicas. Esta "facilidad" se ha plasmado durante décadas en diferentes normativas tales como aquellas que definen la calidad de las aguas de baño, cultivo de moluscos, etc.

Los parámetros más utilizados para determinar criterios de calidad de las aguas pueden agruparse en cinco clases:

- Parámetros físicos
- Parámetros químicos: inorgánicos y orgánicos
- Parámetros radiactivos
- Parámetros microbiológicos y biológicos.

Los parámetros físicos suministran información muy clara de algunas características del agua: sólidos en suspensión, temperatura (contaminación térmica), color, olor, sabor, turbidez, conductividad, etc.

Los parámetros químicos inorgánicos abarcan todos los gases en disolución, aniones, cationes y metales que tienen una significación sanitaria y/o ambiental, o que comunican al agua algunas de las características clasificadas como indeseables para su uso. Los más utilizados son:

- * *pH* (acidez o basicidad)
- * *Gases disueltos*: O₂, CO₂, SH₂
- * *Aniones*: nitratos, nitritos, fosfatos, fluoruros, cianuros, etc.
- * *Cationes*: amonio, dureza (calcio, magnesio), etc.
- * *Metales pesados*: mercurio, cadmio, cobre, zinc, plata, cromo, etc.

Los parámetros químicos orgánicos constituyen el grupo más amplio y complejo. Abarcan desde algunos indicadores del contenido orgánico del agua (demanda química de oxígeno, carbono orgánico), hasta numerosos compuestos contaminantes que llegan a las aguas procedentes de vertidos de diferente naturaleza (detergentes, aceites y grasas, fenoles, pesticidas organoclorados, hidrocarburos policíclicos aromáticos, etc.).

Los parámetros radiológicos se refieren al control de la presencia en un agua de radiación alfa, beta, o gamma.

Los parámetros microbiológicos y biológicos abarcan desde los parámetros bacterianos y víricos hasta el resto de organismos vegetales o animales, susceptibles de estar presentes en las aguas. Los más utilizados e importantes desde un punto de vista sanitario son los "índices de contaminación fecal".

Con objeto de tener una visión global de los parámetros más relevantes incluidos en las diferentes normas de calidad de aguas, se ha construido la tabla siguiente.

Tabla C II.1 Parámetros incluidos en diferentes normativas de calidad de aguas en agua de mar

| Parámetros | Baño | Moluscos | Calidad de aguas en Andalucía | Sustancias peligrosas | Marco de Aguas Otros |
|--|---|---|--|---|--|
| Biológicos | | | | | Fitoplancton ² Otra flora acuática ² Macroinvertebrados ² Peces ² |
| Microbiológicos | Coliformes totales Coliformes fecales Estreptococos fecales Salmonellas Enterovirus | Coliformes fecales | | | |
| Físico-Químicos | pH Coloración Transparencia O ₂ disuelto Aceites minerales | pH Temperatura Coloración Materias en suspensión Salinidad O ₂ disuelto | pH Coloración Transparencia Materias en suspensión O ₂ disuelto Aceites y grasas Salinidad | | pH ² Temperatura ² O ₂ disuelto ² Cianuros ² |
| Nutrientes. Medidas de N, P y C | Amoníaco Nitrógeno Kjeldhal Nitratos Fosfatos | | Carbono orgánico Amonio Nitritos Nitratos Fósforo total | | No definidos ² |
| Compuestos orgánicos | Tensiactivos Fenoles | Hidrocarburos de origen petrolero | Hidrocarburos no polares Detergentes Fenoles | | No definidos ² |
| Metales pesados | As, Cd, Cr (Cr), Pb, Hg | Ag, As, Cd, Cr (VI), Cu, Hg, Ni, Pb, Zn | As, Cd, Cu, Cr, (Cr (VI)), Sn, Hg, Ni, Pb, Se, Ti, Zn | Hg Cd | Nitratos ¹ As, Cd, Hg, Pb, Ni ² |
| Sustancias peligrosas | Plaguicidas (padathión, HCH, dieldrín) | Sustancias organohalogenadas | Cianuros libres Fluoruros Hexaclorociclohexano Tetracloruro de carbono DDTs Pentaclorofenoles Aldrín y derivados Cloroformo Hexaclorobenceno Hexaclorobutadieno 1,2-dicloroetano Tricloroetileno Percloroetileno Triclorobenceno Otros plaguicidas | Hexaclorociclohexano Tetracloruro de carbono DDTs Pentaclorofenoles Aldrín y derivados Cloroformo Hexaclorobenceno Hexaclorobutadieno 1,2-dicloroetano Tricloroetileno Percloroetileno Triclorobenceno | Sust Peligrosas ² : Alacloro Antraceno Atrazina Benceno Difeniléteres bromados C ₁₀₋₁₃ -cloroalcanos Clorofeninfos Cloropirifos 1,2-dicloroetano Diclorometano Di(2-ethylhexil)ftalato Diurno Endosulfán Fluoranteno Hexaclorobenceno Hexaclorobutadieno Hexaclorociclohexano Isoproturón Naftaleno 4-p-nonilfenol p-ter-octilfenol Pentaclorobenceno Pentaclorofenol Benzo(a)pireno Benzo(b)fluoranteno Benzo(g,h,i)perileno Benzo(k)fluoranteno Indeno(1,2,3-cd)pireno Simazina Tributiltín catión 1,2,4-triclorobenceno Triclorometano Trifluralina. Otros compuestos contaminantes no definidos aún ² |
| Otros | Sólidos flotantes | Sustancias que influyen en el sabor de los moluscos Saxitoxina | | | Indicadores hidromorfológicos ² : continuidad, hidrología y morfología |

1 Normativa referente a la contaminación por nitratos procedente de fuentes agrarias

2 Directiva 60/2000/EC, Marco de Aguas

Debido al coste que supone el análisis de todos estos parámetros las administraciones públicas reducen su número, de tal forma que generalmente los programas de vigilancia ambiental se limitan al análisis de parámetros *in situ* (temperatura, pH, O₂ disuelto, transparencia, salinidad), nutrientes (especiación de nitrógeno, fósforo y silice), algunos indicadores de contaminación antropogénicas (tensioactivos aniónicos, fenoles, grasas y aceites) y otros compuestos de repercusión directa sobre un zona específica dependiendo de las actividades que se den en las proximidades del área costera (p.e. compuestos organohalogenados de uso pesticida en áreas de cultivo). De estos conjuntos de parámetros, es especialmente importante el control del contenido en nutrientes en las aguas no sólo por las implicaciones ambientales que tienen las altas concentraciones de nutrientes, sino también porque son indicadores directos de la presencia de vertidos principalmente urbanos.

2.1.2 OBJETIVOS DE CALIDAD

La Orden de 14 de febrero de 1997 (BOJA nº 27, de 4 de marzo de 1997) establece los objetivos de calidad de las aguas litorales afectadas por vertidos. Estos objetivos de calidad están expresados como *concentraciones máximas que no deben ser sobrepasadas en las aguas*. La siguiente tabla muestra estos valores para cada una de las cuatro clasificaciones de las aguas litorales andaluzas:

Tabla C II.2. Parámetros incluidos en diferentes normativas de calidad de aguas en agua de mar

| Parámetros | AE | AL | AN | AML |
|---|---|-------------|-------------|-------------|
| 1 Coloración, después de filtración, mg/L Pt/Co | MN+10 | MN+10 | MN+10 | MN+10 |
| 2 Transparencia, m (Disco Secchi) | MN-1 | MN-2 | MN-1 | MN-1 |
| 3 pH (escala NBS) | 7-9 | 6-9 | 6-9 | 6-9 |
| 4 Sólidos en suspensión, mg/L | 1,15 MN | 1,3 MN | 1,2 MN | 1,2 MN |
| 5 Oxígeno disuelto, % sat. O ₂ | 80 | 60 | 70 | 70 |
| 6 C.O.T., mg/L | 2 | 5 | 3 | 3 |
| 7 Nitratos, µg/L | 700 | 1400 | 1000 | 1000 |
| 8 Hidrocarburos no polares | Sin película en la superficie del agua y ausencia de olor | | | |
| 9 Aceite y Grasas, mg/L | 1 | 5 | 3 | 3 |
| 10 Detergentes, µg/L | 100 | 300 | 200 | 200 |
| 11 Fenoles (índice de fenoles), µg/L C ₆ H ₅ OH | 20 | 50 | 30 | 30 |
| 12 Salinidad | 0,9MN-1.1MN | 0,9MN-1.1MN | 0,9MN-1.1MN | 0,9MN-1.1MN |
| Sustancias Peligrosas | | | | |
| 13 Cianuros libres, µg/L | 5 | 10 | 5 | 5 |
| 14 Fluoruros, mg/L | 1,7 | 1,7 | 1,7 | 1,7 |
| 15 Amonio, µg/L | 600 | 1200 | 1000 | 1000 |
| 16 Nitritos, µg/L | 600 | 1000 | 600 | 600 |
| 17 Fósforo total, µg/L | 600 | 800 | 600 | 600 |
| 18 Arsénico, µg/L | 25 | 50 | 25 | 25 |
| 19 Cadmio, µg/L | 2,5 | 5 | 2,5 | 2,5 |
| 20 Cobre, µg/L | 20 | 40 | 20 | 20 |
| 21 Cromo total, µg/L | 10 | 20 | 10 | 10 |
| 22 Cromo VI, µg/L | 4 | 6 | 4 | 4 |

| Parámetro | AE | AL | AN | AML |
|--|---|-----|-----|-----|
| 23 Estaño, µg/L | 50 | 60 | 50 | 50 |
| 24 Mercurio total, µg/L | 0,3 | 0,5 | 0,3 | 0,3 |
| 25 Níquel, µg/L | 25 | 50 | 25 | 25 |
| 26 Plomo, µg/L | 10 | 20 | 10 | 10 |
| 27 Selenio, µg/L | 1 | 1 | 1 | 1 |
| 28 Titanio, µg/L | 20 | 20 | 20 | 20 |
| 29 Zinc, µg/L | 60 | 80 | 60 | 60 |
| 30 Hexaclorociclohexano, ng/L | 20 | 20 | 20 | 20 |
| 31 Tetracloruro de carbono, µg/L | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 32 DDTs, µg/L | 10 para-para DDT 25 DDT total | | | |
| 33 Pentaclorofenoles, µg/L | 2 | 2 | 2 | 2 |
| 34 Aldrín y derivados, ng/L | 10 Aldrín, Dieldrín y/o Clordano 5 Endrín y/o Isodrín | | | |
| 35 Cloroformo, µg/L | 12 | 12 | 12 | 12 |
| 36 Hexaclorobenceno, ng/L | 30 | 30 | 30 | 30 |
| 37 Hexaclorobutadieno, ng/L | 100 | 100 | 100 | 100 |
| 38 1,2-dicloroetano, µg/L | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 39 Tricloroetileno, µg/L | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 40 Percloroetileno, µg/L | 10 | 10 | 10 | 10 |
| 41 Triclorobenceno, µg/L | 0,4 | 0,4 | 0,4 | 0,4 |
| 42 Otros plaguicidas, PCBs y PTs, ng/L | 100 por sustancia individualizada 500 para las sustancias en total | | | |

AE: aguas especiales
AL: aguas limitadas
AN: aguas normales
AML: aguas menos limitadas
MN: concentración normal en aguas no afectadas por los vertidos - media normal-

2.2. ÍNDICES DE CALIDAD AMBIENTAL

En cualquier programa de seguimiento ambiental se generan un gran número de datos los cuales son difíciles de analizar e interpretar debido a la complejidad de las relaciones entre las variables medidas. En ocasiones, y sobre todo cuando las administraciones públicas necesitan una traducción de estos datos en términos sencillos, es más útil desarrollar fórmulas simples que integren los resultados, que utilizar técnicas estadísticas complejas de más difícil y especializada comprensión. En este sentido, el uso de índices ambientales han jugado un importante papel y así lo reflejan numerosos autores y administraciones públicas en diferentes trabajos de investigación muchos de los cuales se remontan hasta los años 70 (Prati, *et al.*, 1971; Train, 1972; Londwehr y Deininger, 1976; Scottish Development Department, 1976; Ross, 1977; Bolton, *et al.*, 1978; Ott, 1978; Provencher y Lamontagne, 1979; Read *et al.*, 1982; Couillard y Lefebvre, 1985; Long y Chapman, 1985; Chapman, 1986; Chapman *et al.*, 1987; House y Ellis, 1987; Zou *et al.*, 1988; Chapman, 1990; Smith, 1990; Chapman *et al.*, 1991; Newman, 1992; Canfield *et al.* 1994; Hall, *et al.* 1994; Saeger, 1994; British Columbia Minister of Environment Lands and Parks, 1995; Benito de Santos, y Figueras Comas, 1996; Chapman *et al.* 1996; RIVM, 1997; Del Valls *et al.*, 1998; Zanbergen *et al.*, 1998; Stambuk-Giljanovic, 1999; Zagatto *et al.*, 1999; Garrido *et al.*, 2000; Shin y Lam, 2001; Acevedo, 2001; Perales, 2001; Tovar, 2001).

Un porcentaje mayoritario de estos índices están referidos a aguas continentales (ríos, arroyos, lagos), sin embargo comienza a ser importante el número de índices desarrollados en el medio marino e incluso en sedimentos.

2.2.1. USOS DE LOS ÍNDICES DE CALIDAD AMBIENTAL

Desde la primera década de formulación y aplicación de estos índices ya se describieron sus principales utilidades y aplicaciones. Así, Ott (1978) apunta seis posibles aplicaciones de los índices de calidad ambiental:

- i) Ayudar a las agencias ambientales en priorizar la prevención en las fuentes de contaminación.
- ii) Clasificar sitios degradados.
- iii) Evaluación del cumplimiento de estándares ambientales.
- iv) Determinación de cambios temporales de condiciones ambientales.
- v) Comunicación pública.
- vi) Evaluación de programas de seguimiento.

Desde la realización de este listado hasta la actualidad, se han ido perfilando algunos de estos usos y las ventajas que proporcionan estos índices en la evaluación de la calidad ambiental. Sin embargo también se han encontrado algunos inconvenientes. Zanbergen y Hall (1998) realizan las siguientes consideraciones relativas al uso de índices de calidad ambiental:

Tabla C II.3.
Consideraciones acerca del uso de los índices de calidad ambiental

| Ventajas de los índices | Desventajas de los índices |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> — Mediante un único valor, se representan las medidas de una gran variedad de parámetros, y por tanto, se reduce la complejidad — Permiten la combinación de varios parámetros de diferentes unidades en una única medida — Facilitan la comunicación de los resultados puesto que carece de unidades, es decir, es adimensional | <ul style="list-style-type: none"> — Establecen tendencias a partir de un único parámetro invisible — Los resultados son muy sensibles a cómo esté diseñado o calculado — La Interpretación de los resultados es específica del índice particular y no puede extrapolarse a índices similares — Muchos índices se desarrollan para ecosistemas específicos y no son de aplicación a otros ambientes — No consideran interacciones entre parámetros |
| ¿Qué se puede hacer con los índices? | ¿Qué no se puede hacer con los índices? |
| <ul style="list-style-type: none"> — Ilustrar las tendencias espaciales y temporales — Explorar las relaciones con otras variables mediante representaciones gráficas y correlaciones — Comparar los valores del índice con valores de lugares de referencia establecidos como partes del desarrollo del índice | <ul style="list-style-type: none"> — Hacer cálculos, tales como promediar a lo largo del tiempo, cálculo de medidas, etc, u otros cálculos con índices diferentes de para los que éstos fueron diseñados — Realizar análisis de regresión — Dar significados a los valores de los índices sin tener referencias de cómo está diseñado o para qué fue diseñado |

2.2.2. DISEÑO DE LOS ÍNDICES DE CALIDAD AMBIENTAL

El procedimiento general para obtener un índice es el siguiente. Los índices se diseñan a partir de un número prefijado de parámetros que definen la calidad del agua. A partir de las mediciones realizadas a cada parámetro se obtiene un subíndice. Finalmente, todos los subíndices se combinan de una forma determinada (función multiplicativa, aditiva, etc.) para obtener un valor numérico final, es decir el valor del índice de calidad ambiental (Smith, 1990).

De la literatura científica revisada se ha comprobado que existen dos enfoques a la hora de diseñar y aplicar índices de calidad de aguas:

- i) Índices basados en la frecuencia y la magnitud de valores que superan los objetivos de calidad de las aguas para diferentes usos.
- ii) Índices de calidad basados en la variabilidad (estacional o espacial) de los parámetros analizados.

En la tabla C II.4. y C II.5. se resumen algunos de los índices más interesantes pertenecientes a ambos grupos.

Tabla C II.4.
Algunos índices de calidad relativos al cumplimiento de objetivos de calidad

| ¾ Diseño del índice ¾ | ¾ Nomenclatura ¾ | ¾ Descripción del índice ¾ | ¾ Referencia bibliográfica ¾ |
|--|------------------|---|--|
| $I = \frac{1}{100} \left(\sum_{i=1}^n s_{sub} w_i \right)^2$ | → | <ul style="list-style-type: none"> s_{sub}: subíndice del parámetro i-ésimo w_i: es el peso del parámetro n: número de parámetros | Scottish Development Department (1976) |
| <p>Este índice está definido para producir un valor máximo de 100 (correspondiente a aguas prístinas, aguas no-afectadas o alguna terminología similar); y un valor mínimo de cero (altamente polucionada; totalmente imposible cualquier uso asignado, o alguna terminología similar). Basado en niveles legales de parámetros y contaminantes para la protección de un uso determinado.</p> | | | |
| $WQI = \frac{WQE}{WQE_{MAC}}$ $WQE = \sum_{i=1}^n q_i w_i$ | → | <ul style="list-style-type: none"> WQI: Water Quality Index (índice de calidad de aguas) WQE: Water Quality Evaluation (evaluación de la calidad del agua) MAC: maximum admissible concentration q_iw_i: suma ponderada q_i: valores de calidad del agua del parámetro i w_i: factor de peso del parámetro i n: número de parámetros | Stambuk-Giljanovic (1999) |
| <p>El índice se obtiene dividiendo una estimación de la calidad del agua por la concentración máxima admisible de las aguas clasificadas como de primera clase según el Acta de Clasificación de las Aguas en Croacia (4 clases de agua, la primera clase es la más exigente)</p> <p>Parámetros utilizados: temperatura, mineralización, coeficiente de corrosión, oxígeno disuelto, demanda bioquímica de oxígeno, nitrógeno total, nitrógeno orgánico, fósforo total y coliformes totales</p> | | | |
| <p>IPCA = Promedio de los tres pesos más críticos de x las sustancias tóxicas</p> | → | <p>El peso más crítico del grupo principal de parámetros</p> <p>IPCA: Water Community Preservation Index</p> | Zagatto <i>et al.</i> (1998) |
| <p>Se establecen diferentes pesos (1, 2 y 3) para cada parámetro de acuerdo de su concentración en el agua y el efecto potencial sobre la biota: Peso I, agua con propiedades necesarias para la supervivencia y reproducción de las comunidades acuáticas; Peso II, agua con las propiedades necesarias para la supervivencia de las comunidades acuáticas, pero la reproducción puede verse afectada; Peso III, agua con las propiedades necesarias para la supervivencia de las comunidades, pero a veces puede verse afectada. Los valores oscilan entre 1 y 9. Un IPCA igual a 1 presenta una calidad adecuada, igual a 2 es de calidad regular y mayor de 3 es inadecuada. Los parámetros se dividen en dos: Parámetros tóxicos (cobre, zinc, plomo, cromo y níquel, tensioactivos y fenoles); y parámetros principales (oxígeno disuelto, pH y toxicidad de <i>Ceriodaphnia dubia</i>).</p> | | | |
| $BCWQI = \frac{\sqrt{(F_1)^2 + (F_2)^2 + \left(\frac{F_3}{3}\right)^2}}{1,453}$ | → | <ul style="list-style-type: none"> BCWQI: British Columbia Water Quality Index F₁: número de objetivos no cumplidos como porcentajes de todos los objetivos comprobados F₂: frecuencia en la que no se cumplen los objetivos expresado como porcentaje de todas las veces que se han comprobado F₃: es la desviación máxima obtenida en cualquiera de los objetivos | Zandbergen y Hall (1998) |
| <p>Los tres factores son valores porcentuales entre 0 y 100. Los valores del índice oscilan entre 0 y 100. Cuanto más bajo sea este valor, mejor será la calidad del agua</p> | | | |

Tabla C II.5.
Algunos índices de calidad relativos a la variabilidad de los parámetros

| ¾ Diseño del índice ¾ | ¾ Nomenclatura ¾ | ¾ Descripción del índice ¾ | ¾ Referencia bibliográfica ¾ |
|---|------------------|---|---|
| $I = \frac{\sum_{i=1}^n RTR_i}{n} \quad \forall i$ $RTR_i = \frac{i_{ij}}{(i_i)_0}$ | | RTR-Ratio to reference: Razón respecto a la estación de referencia i=parámetro j= estación de muestreo n=número total de variables v= valor del parámetro i 0=estación de referencia | Chapman (1990; 1991) |
| <p>Los RTR se obtienen dividiendo el parámetro medido por el valor obtenido en la estación de referencia. El índice se calcula como el promedio de los RTR incluidos en la definición del índice.</p> <p>Existen diversos trabajos en los cuales se definen diversos RTR. Los propuestos por Chapman (Chapman, 1991) se basan generalmente en parámetros relativos a caracterizaciones de las comunidades bénticas afectadas por algún problema de polución (Abundancia de taxones, dominancia, nº de organismos indicadores, etc.)</p> | | | |
| $MSPI = \frac{(\sum q_i \cdot w_i)^2}{100}$ | | MSPI: Marine Sediment Pollution Index | Shin y Lam (1991) |
| <p>Para el cálculo del índice utiliza los factores obtenidos de un análisis PCA/FA realizado previamente a las variables de estudio. Los coeficientes q_i oscila entre 0 (mejor calidad posible) y 100 (pero calidad posible) obtenidos a partir de un sistema de clasificación basado en los percentiles del conjunto de datos. El estudio incluye 24 variables físico-químicas analizadas en cada muestra de sedimento.</p> | | | |
| $I = \frac{\sum_{i=1}^n RTM_i}{n} \quad \forall i$ $RTM_i = \frac{v_{ij}}{v_{max}}$ | | RTM-Ratio de maximum: Razón respecto a la estación que presenta mayor valor del parámetro en cuestión i=parámetro j=estación de muestreo n=número total de variables 0=estación de referencia | Hall <i>et al.</i> (1994) Del Valls <i>et al.</i> (1998) Garrido <i>et al.</i> (2000) Acevedo (2001) Perales (2001) Tovar (2001) |
| <p>Los RTM se definieron para evitar la alta variabilidad de los RTR y un exceso en el peso relativo de algunos parámetros en el cómputo del índice final. Los parámetros utilizados en los trabajos de estos autores comprenden un amplio conjunto de variables físico-químicas (metales pesados, contaminantes orgánicos, nutrientes, etc.) e incluso microbiológicas (microorganismos indicadores de contaminación fecal). Son índices muy versátiles permitiendo una gran combinación de parámetros, aplicación a diversos compartimentos ambientales (sedimento, agua, comunidades biológicas). De amplia aplicación en el litoral de Cádiz en los últimos años.</p> | | | |

Puesto que la presente memoria tiene como objetivo principal revisar, modificar y, cuando no estén definidos, establecer objetivos de calidad en las aguas litorales, no sería de aplicación el primer grupo de índices. Además, para obtener un índice representativo, se precisa aumentar las frecuencias de muestreo en cada área litoral, condición que no se cumple en este estudio.

Así pues, y como veremos en apartados posteriores, para la evaluación de la calidad ambiental de las áreas litorales en orden de establecer una zonificación, se han aplicado exclusivamente los índices pertenecientes al segundo grupo. En el apartado de material y métodos del presente capítulo se detalla cómo se han definido estos índices.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. ZONAS DE ESTUDIO

Como hemos visto en el *Capítulo I –Introducción–*, existen diversas clasificaciones de las aguas litorales basadas en criterios ecológicos y hidromorfológicos. Así, tenemos aguas clasificadas como *aguas sensibles* y *menos sensibles* para aguas afectadas por vertidos de aguas residuales urbanas, y en la Comunidad Autónoma Andaluza tenemos una clasificación en *aguas especiales, limitadas, normales y menos limitadas* aplicable a aguas afectadas por vertidos industriales y urbanos.

En el Golfo de Cádiz existen tres grandes áreas industriales y urbanas cuya problemática ambiental se ha reflejado en diversos informes y monografías editados por la administración autonómica (CMA, 1989 a 2001). Estas áreas son la Ría de Huelva, la Bahía de Cádiz y la Bahía de Algeciras. Durante décadas, los vertidos industriales y urbanos de estas áreas han incidido directamente sobre zonas litorales limitadas afectando a la calidad de sus aguas. Además, en estas zonas litorales se produce un importante tráfico marítimo debido a la localización de importantes puertos comerciales. Este tráfico introduce vertidos al mar ocasionados por la limpieza y otras operaciones de los buques.

En el entorno de la Bahía de Cádiz, existe una gran extensión de marismas y caños de un alto valor ecológico. El Río Iro es un pequeño cauce que desemboca en el caño de Sancti Petri y que recoge principalmente las aguas de escorrentía de una amplia región agrícola. El estuario de este río es muy particular puesto que en prácticamente toda su extensión, la morfología, vegetación e hidrodinámica es similar a la red de caños y marismas circundantes. Sin embargo, la particularidad que lo hace especialmente interesante para incluirlo como zona de estudio, es que está fuertemente afectado por el vertido de una estación de tratamiento de aguas residuales urbanas procedentes del núcleo central de la localidad de Chiclana de la Frontera. Además, los procesos de dilución y de renovación en este cauce y en general en todo el sistema de marismas está muy limitado por lo que el estudio de los niveles de nutrientes en esta agua es muy significativo.

Si bien existen muchas otras aguas limitadas en el Golfo de Cádiz, se han seleccionado estas cuatro grandes áreas litorales –Ría de Huelva, Bahía de Cádiz, estuario del Río Iro y Bahía de Algeciras– para la realización del diagnóstico del estado de calidad de sus aguas. Se han seleccionado cuatro áreas, porque si bien pueden ser clasificadas como aguas limitadas, presentan diferencias morfológicas y ecológicas entre sí, las cuales se resumen a continuación:

- (1) **Ría de Huelva.** Cuerpo de agua semicerrado formado artificialmente a partir de la construcción del espigón Juan Carlos I. La actividad industrial y urbana que afecta a esta zona puede catalogarse como de muy alta.
- (2) **Bahía de Cádiz.** Bahía natural que por su morfología está dividida en tres zonas diferenciadas:
 - Saco exterior de la Bahía, de profundidad media de 13 metros y con un buen intercambio de aguas con la zona externa.
 - Saco interior de la Bahía, con una profundidad muy somera, y de circulación dependiente del intercambio con el saco exterior
 - Zona interior de marismas y caños, muy afectados por las mareas y cuya circulación de aguas depende del saco interior.

La concentración industrial de la zona puede catalogarse como de media-baja, y la concentración urbana como de media-alta.

- (3) **Río Iro.** Estuario natural integrado en el sistema de marismas y caños. La circulación e intercambio de aguas está muy condicionado por el régimen de mareas y por la calidad de las aguas del sistema global de marismas.

Muy afectado por el vertido directo de un vertido tratado de aguas residuales.

- (4) **Bahía de Algeciras.** Bahía con una profundidad media muy elevada (profundidad media de aprox. 250 m y en zonas abisales de más de 850 m). El intercambio de aguas depende fuertemente de la marea y de la entrada de aguas procedentes del Atlántico o del Mediterráneo.

La actividad urbana e industrial en la zona puede catalogarse como media-alta.

En los siguientes apartados se hace una descripción más detallada de las zonas de estudio.

3.1.1. RÍA DE HUELVA

3.1.1.1. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

La primera área litoral del golfo de Cádiz caracterizada ha sido el Canal del Padre Santo en la provincia de Huelva. En esta zona se localiza uno de los principales Polos Industriales de la Comunidad Autónoma de Andalucía así como una de las principales zonas de producción minera. Dentro del litoral onubense se ha seleccionado el Canal del Padre Santo porque se trata de la desembocadura de las dos arterias fluviales principales de la provincia, el Río Tinto y el Río Odiel, los cuales reciben la mayor parte de los efluentes procedentes de las actividades mineras e industriales de la zona. Esta zona, además de soportar una gran presión industrial, recoge los vertidos urbanos de la población de la ciudad de Huelva y de la poblaciones ribereñas. Además, la circulación restringida de renovación de aguas que presenta el Canal hace que esta sea una zona especialmente afectada por vertidos de diversa naturaleza.

3.1.1.2. NÚCLEOS URBANOS, VERTIDOS CATALOGADOS, ZONAS PROTEGIDAS. RÍA DE HUELVA

Núcleos urbanos

El núcleo urbano más importante localizado en la ría es la localidad de Huelva con una población de más de 140000 habitantes, seguido por Aljaraque de unos 12000 habitantes y Palos de la Frontera con algo más de 7000 habitantes. En la desembocadura se encuentra Mazagón y al otro extremo de la orilla izquierda de la ría se encuentra la localidad de Punta Umbría de 10000 habitantes.

Tabla C II.6.a. Datos relativos a la Ría de Huelva. Núcleos urbanos y población

| Población | Nº Habitantes -Instituto Nacional de Estadística, 2001- |
|--|--|
| Huelva | 142284 |
| Aljaraque | 12026 |
| Palos de la Frontera, Mazagón y La Rábida | 7314 |
| Moguer | 15219 |
| Punta Umbría | 12266 |
| | 189109 habitantes |

Vertidos catalogados

La industria química de Huelva se concentra fundamentalmente en dos términos municipales: Huelva y Palos de la Frontera. La mayoría de las empresas se caracterizan por el elevado caudal de sus vertidos así como por la presencia de un alto contenido en metales pesados (Junta de Andalucía, 1996).

En 1988 se inició el Plan Corrector de Vertidos Químicos Industriales en la Ría de Huelva. En este Plan, las empresas participantes se comprometieron a la construcción de estaciones depuradoras, unificación de efluentes para su tratamiento previo al vertido, reducción o eliminación tanto de los caudales como de determinados contaminantes, así como otras actuaciones que permitirán en el futuro la recuperación progresiva de la Ría de Huelva.

Las fuentes contaminantes de la ría se pueden catalogar en tres grandes grupos:

Vertidos industriales, constituidos por emisiones de gases y efluentes líquidos producidos por las industrias situadas en la Ría de Huelva, unas cuarenta plantas dedicadas fundamentalmente a la producción química: refinado de petróleo y petroquímica, aprovechamiento de piritas y obtención de

sulfúrico, cobre, fosfórico y fertilizantes, preparación de derivados del titanio, producción de sosa, cloro y cloroderivados a partir de sal y producción de celulosa.

Vertidos de aguas residuales urbanas, correspondientes a la población asentada en la Ría.

Aportes fluviales, como consecuencia de la elevada actividad minera desarrollada en los últimos 150 años la cual ha liberado grandes cantidades de ácido sulfúrico, sulfatos y metales. También hay que sumar los aportes naturales de dichos ríos.

En 1996, la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía realizó el *Inventario de Vertidos líquidos al Litoral de Andalucía* (Junta de Andalucía, 1996). En éste se recoge de forma cartografiada y documentada la situación y características principales de los vertidos documentados hasta esa fecha. La siguiente tabla resume el número y características principales de los vertidos que afectan al sistema estuárico de la Ría de Huelva.

Tabla C II.6.b. Datos relativos a la Ría de Huelva. Número y tipo de vertidos catalogados (Junta de Andalucía, 1996)

| Tipo de vertido | Número | Tamaño del vertido | Número | Situación administrativa | Número |
|----------------------------------|--------|----------------------------|---------------------------------|--------------------------|--------|
| Doméstica (separativa) | 2 | > 1000 m ³ /día | 16 industriales | No Autorizados | 33 |
| Pluviales (separativa) | 0 | | 3 urbanos | | |
| Doméstica + pluviales (unitaria) | 45 | < 1000 m ³ /día | 10 industriales | Autorizados | 29 |
| Agropecuaria | 0 | | 40 urbanos | | |
| Industrial | 31 | | No activo o de forma esporádica | | |
| Otros | 1 | | | | |

Zonas protegidas

En la zona de estudio y alrededores se encuentra una gran número de zonas de especial interés ambiental catalogadas con diferentes figuras de protección según la Ley 2/89 de la Comunidad Autónoma de Andalucía sobre espacios protegidos (LEPA: Ley de Espacios Protegidos de Andalucía). Estas son las siguientes:

Tabla C II.6c. Datos relativos a la Ría de Huelva. Resumen de zonas protegidas (Sales y López-Aguayo, 1996)

| Denominación del espacio | Figuras de protección según la LEPA | Extensión | Descripción y otras observaciones |
|--------------------------------------|-------------------------------------|-----------|---|
| Marismas de El Burro | Reserva Natural | 597 Ha. | Estuarios y marismas. Lugar de gran valor ornitológico. Presenta problemas de marisqueo incontrolado, presión urbanística y vertidos de zonas industriales y agrícolas adyacentes |
| Marismas del Odiel | Paraje Natural | 7185 Ha. | |
| Isla de En Medio | Reserva Natural | 480 Ha. | |
| Esteros de Domingo Rubio | Paraje Natural | 480 Ha. | Estuarios y marismas. Zona de marisma mareal. El área presenta desecación y relleno, así como vertidos |
| Marismas y enebrales de Punta Umbría | Paraje Natural | 162 Ha. | Marismas y zonas de dunas. Presenta una fuerte presión urbanística |
| Lagunas de Palos y las Madres | Paraje Natural | 693 Ha. | Lagunas litorales. Recibe vertidos agrícolas, desecaciones y transformaciones para suelo industrial |

3.1.1.3. ESTACIONES DE MUESTREO EN LA RÍA DE HUELVA. TOMA DE MUESTRA

Con objeto de realizar un evaluación completa de este sistema acuático y considerando la morfología de la ría, las grandes dimensiones y la situación de los núcleos urbanos y los polos industriales, se diseñaron los transectos y estaciones de muestreo que se describen a continuación.

Las estaciones de muestreo se dispusieron en cuatro transectos transversales a la ría y en un gran transecto longitudinal.

- Transecto H1.* Delimita la zona de confluencia de los ríos Tinto y Odiel y el comienzo del Canal del Padre Santo. Este transecto representa la calidad de las aguas provenientes de la confluencia de dos ríos altamente antropizados.
- Transecto H2.* Se localiza en la zona afectada por los vertidos de un polo industrial. Este transecto se localiza transversal a la ría tomando como referencia en la orilla derecha del mapa de localización, el interior del muelle Reina Sofía en el polo industrial.
- Transecto H3.* Debido a la gran longitud de la ría, este transecto se situó intermedio a la zona de gran influencia antrópica, esto es H1 y H2 (a priori de aguas de peor calidad) y el transecto H4 situado en la bocana de la ría.
- Transecto H4.* Transecto situado en la bocana de la ría. La estación más próxima a la orilla derecha se sitúa próxima a la localidad de Mazagón. Si bien en principio se consideró como el transecto control del sistema por ser el más exterior, en diversas ocasiones se determinaron concentraciones de algunos parámetros superiores a las medidas en el transecto H3.
- Transecto H5.* Transecto longitudinal de la ría. Las estaciones de muestreo de este transecto se localizaron en el punto medio entre transectos transversales. Este transecto incluye además dos puntos muy importantes situados aguas arriba de los ríos Tinto y Odiel, con objeto de estudiar el aporte de ambos ríos a la calidad de las aguas del canal. Este transecto representaría la evaluación espacial de la contaminación a lo largo de toda la Ría.

3.1.1.4. PLANIFICACIÓN Y TOMA DE MUESTRA EN LA RÍA DE HUELVA

En la Ría de Huelva se realizaron cuatro muestreos: invierno y verano de 1999 e invierno y verano de 2000.

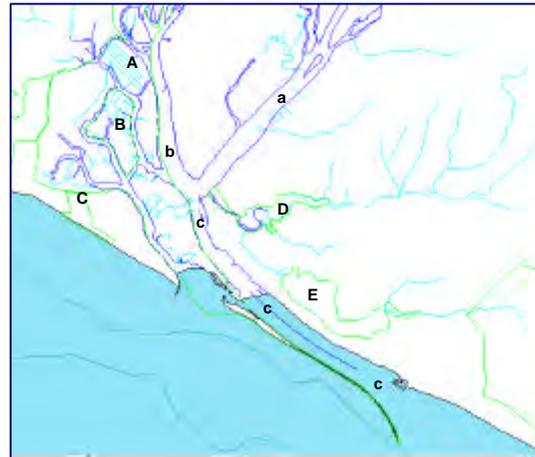
Previamente al primer muestreo, sobre una carta náutica se trazaron los transectos y se situaron (latitud y longitud) las estaciones de muestreo en función de la localización de los polos industriales y los centros urbanos tal y como se ha explicado en el apartado anterior. La aproximación a las estaciones y la toma de muestra se hizo desde la embarcación AMA VI perteneciente a la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía.

Una vez en la zona de estudio, se corrigió la posición de los transectos y las estaciones de muestreo con objeto de obtener muestras en zonas de especial interés (p.e. ríos Tinto y Odiel) o adaptar los transectos a la morfología de la ría y al calado. Las localizaciones corregidas se almacenaron en un GPS para así realizar la toma de los diferentes muestreos en las mismas estaciones seleccionadas. La tabla C II.7. muestra la localización y codificación definitiva de las estaciones.

Las muestras líquidas se tomaron a tres profundidades empleando una botella muestreadora tipo Ruttner de 2 L de capacidad. En aquellas estaciones en las que la profundidad es escasa, sólo se han tomado de una o dos profundidades.

De las muestras de cada profundidad se separó una alícuota y se almacenó en frascos estériles para el posterior estudio microbiológico, mientras que con el agua restante se preparó una muestra compuesta representativa de la columna de agua, y formada por la mezcla de volúmenes iguales de cada profundidad. Finalmente se obtuvo una muestra compuesta representativa de cada transecto formada a partir de la mezcla de volúmenes iguales de agua procedente de cada estación de muestreo. De forma paralela a la toma de muestras y para todas las profundidades, se realizaron medidas in situ de pH y temperatura.

Mapa C II.1.
Ría de Huelva. Principales núcleos urbanos y zonas protegidas. Transectos de muestreo



POBLACIONES

- 1. –Aljaraque
- 2. –Huelva
- 3. –Moguer
- 4. –Palos de la Frontera
- 5. –La Rábida
- 6. –Punta Umbría
- 7. –Mazagón

- Núcleos urbanos
- Espacios Naturales
- Hidrología principal
- Hidrología secundaria
- Transectos de muestreo

ESPACIOS NATURALES PROTEGIDOS

- A. Paraje Natural –Marismas del Odiel
- B. Reserva natural –Isla de Enmedio
- C. Paraje natural –Enebrales de Punta Umbría
- D. Paraje natural –Estero de Domingo Rubio
- E. Paraje natural –Lagunas de Palos y las Madres

HIDROLOGÍA PRINCIPAL

- a. –Río Tinto
- b. –Río Odiel
- c. –Canal del Padre Santo

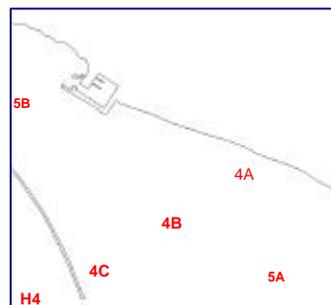
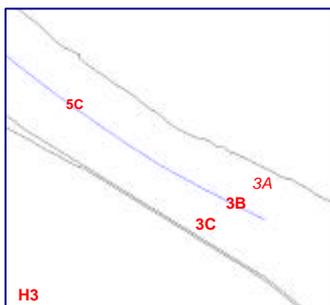
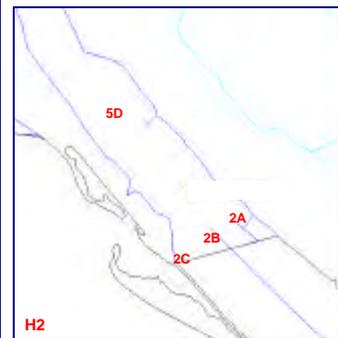
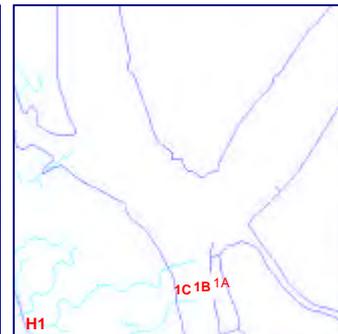
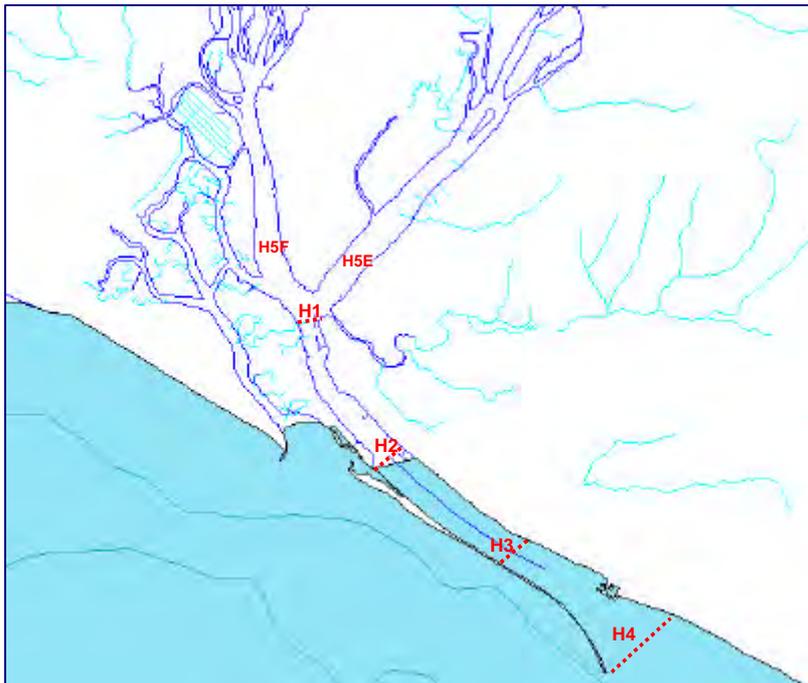


Tabla C II.7.
Datos relativos al muestreo en la Ría de Huelva.

| Transecto | Muestra | Profundidad total de la columna de agua | Localización geográfica | | Submuestras | Profundidad de muestreo |
|-----------|---------|---|-------------------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|
| | | | Latitud | Longitud | | |
| H1 | H1A | 6,5 m | N 37° 12, 107' | W 006° 56, 194' | H1A-a H1A-b | 1 m 4 m |
| | H1B | 22,1 m | N 37° 12, 077' | W 006° 56, 337' | H1B-a H1B-b H1B-c | 1 m 10 m 19 m |
| | H1C | 6,5 m | N 37° 12, 068' | W 006° 56, 503' | H1C-a H1C-b H1C-c | 1 m 3 m 5 m |
| H2 | H2A | 5,5 m | N 37° 10, 150' | W 006° 54, 337' | H2A-a H2A-b H2A-c | 1 m 2 m 4 m |
| | H2B | 13,8 m | N 37° 09, 915' | W 006° 54, 503' | H2B-a H2B-b H2B-c | 1 m 7 m 14 m |
| | H2C | 4 m | N 37° 09, 822' | W 006° 54, 643' | H2C-a H2C-b | 1 m 3 m |
| H3 | H3A | 6 m | N 37° 08, 834' | W 006° 32, 161' | H3A-a H3A-b H3A-c | 1 m 2 m 4 m |
| | H3B | 13,4 m | N 37° 08, 769' | W 006° 52, 270' | H3B-a H3B-b H3B-c | 1 m 6 m 12 m |
| | H3C | 4,9 m | N 37° 08, 631' | W 006° 52, 331' | H3C-a H3C-b H3C-c | 1 m 2 m 4 m |
| H4 | H4A | 10,2 m | N 37° 07, 846' | W 006° 50, 119' | H4A-a H4A-b H4A-c | 1 m 5 m 9 m |
| | H4B | 13,9 m | N 37° 07, 809' | W 006° 50, 220' | H4B-a H4B-b H4B-c | 1 m 7 m 13 m |
| | H4C | 5,2 m | N 37° 07, 578' | W 006° 50, 391' | H4C-a H4C-b H4C-c | 1 m 2 m 4 m |
| H5 | H5A | 6,5 m | N 37° 07, 077' | W 006° 49, 414' | H5A-a H5A-b H5A-c | 1 m 2,5 m 5 m |
| | H5B | 13,4 m | N 37° 08, 242' | W 006° 51, 055' | H5B-a H5B-b H5B-c | 1 m 6 m 12 m |
| | H5C | 12,9 m | N 37° 09, 915' | W 006° 54, 503' | H5C-a H5C-b H5C-c | 1 m 6 m 12 m |
| | H5D | 15,3 m | N 37° 11, 088' | W 006° 55, 810' | H5D-a H5D-b H5D-c | 1 m 7 m 14 m |
| | H5E | 6,5 m | N 37° 12, 986' | W 006° 56, 871' | H5E-a H5E-b H5E-c | 1 m 3 m 5 m |
| | H5F | 3,3 m | N 37° 12, 895' | W 006° 55, 871' | H5F-a H5F-b | 1 m 3 m |

3.1.2. BAHÍA DE CÁDIZ

3.1.2.1. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

La Bahía de Cádiz es una zona de baja-media actividad industrial que soporta una población de aproximadamente 600.000 habitantes. Si bien tradicionalmente las industrias y actividades más importantes de la zona estaban relacionadas con la industria naval, la pesca y la industria salinera, el turismo y actividades paralelas han tenido un gran auge en los últimos años pudiendo verse duplicada e incluso triplicada la población de la zona en épocas estivales. Otra actividad en gran auge es la acuicultura. Estas actividades generan una gran cantidad de residuos orgánicos y un aumento en el contenido de nutrientes en las aguas con los consecuentes efectos que pueden causar.

3.1.2.2. NÚCLEOS URBANOS, VERTIDOS CATALOGADOS, ZONAS PROTEGIDAS

Núcleos urbanos

En la Bahía de Cádiz se localizan varios núcleos urbanos importantes constituidos por los municipios de Cádiz, San Fernando, Puerto Real, El Puerto de Santa María y Rota. A este grupo hay que unir la localidad de Jerez de la Frontera, que si bien queda localizada fuera del ámbito territorial de la bahía, tiene una gran incidencia en sus aguas puesto que la EDAR que trata las aguas residuales de la ciudad, vierte su efluente al Río Guadalete, el cual desemboca posteriormente en la Bahía de Cádiz. De menor importancia pero de un gran aumento de población en los últimos años y pertenecientes a las localidades antes mencionadas, también cabe destacar los núcleos correspondientes a diferentes zonas residenciales tales como Fuente Amarga, Las Redes, Vista Hermosa y Valdelagrana en El Puerto de Santa María, y el Polígono del Río San Pedro en Puerto Real.

Tabla C II.8.a. Datos relativos a la Bahía de Cádiz. Núcleos urbanos y población

| Población | Nº Habitantes -Instituto Nacional de Estadística 2001- |
|--------------------------|---|
| Cádiz | 133363 |
| San Fernando | 88073 |
| El Puerto de Santa María | 76236 |
| Chiclana de la Frontera | 61028 |
| Puerto Real | 35783 |
| Rota | 25053 |
| Jerez de la Frontera | 183273 |
| | 602809 habitantes |

Vertidos catalogados

Para el control de los vertidos de aguas residuales urbanas e industriales, las poblaciones de Rota, El Puerto de Santa María, Puerto Real y Chiclana de la Frontera cuentan con estaciones depuradoras de aguas residuales. Hasta hace poco tiempo San Fernando ha estado vertiendo sus aguas residuales brutas directamente al caño Sancti Petri el cual se constituye como la red central que abastece a gran parte del sistema de caños y marismas del Parque Natural Bahía de Cádiz. Al mismo tiempo la población de Cádiz vertía sus aguas residuales brutas a mar abierto a través de un emisario submarino. Con objeto de cumplir la Directiva 91/271/CEE se construyó recientemente una estación depuradora para tratar las aguas residuales de ambas ciudades. Esta estación se encuentra actualmente en periodo de arranque. Las aguas depuradas de Rota, El Puerto de Santa María y Puerto Real son vertidas a través de emisarios

submarinos al interior de la bahía, mientras que las aguas depuradas de Chiclana, son vertidas al Río Iro cerca de su confluencia en el caño de Sancti Petri.

Tabla C II.8.b. Datos relativos a la Bahía de Cádiz. Número y tipo de vertidos catalogados (Junta de Andalucía, 1996)

| Tipo de vertido | Número | Tamaño del vertido | Número | Situación administrativa | Número |
|----------------------------------|--------|---------------------------------|----------------|--------------------------|--------|
| Doméstica (separativa) | 14 | > 1000 m ³ /día | 4 industriales | No Autorizados | 100 |
| Pluviales (separativa) | 15 | | 9 urbanos | | |
| Doméstica + pluviales (unitaria) | 80 | < 1000 m ³ /día | 7 industriales | Autorizados | 31 |
| Agropecuaria | | | 76 urbanos | | |
| Industrial | 15 | No activo o de forma esporádica | 35 | En trámite | |
| Otros | 7 | | | | |

Zonas protegidas

En la zona de estudio y alrededores se encuentra una gran número de zonas de especial interés ambiental catalogadas con diferentes figuras de protección según la Ley 2/89 de la Comunidad Andaluza sobre espacios protegidos (LEPA: Ley de Espacios Protegidos de Andalucía). Estas son las siguientes:

Tabla C.II.8c. Resumen de zonas protegidas situadas en la Bahía de Cádiz (Sales y López-Aguayo, 1996)

| Denominación del espacio | Figuras de protección según la LEPA | Extensión | Descripción y otras observaciones |
|--|--|-----------|--|
| Bahía de Cádiz | Parque Natural | 10000 Ha. | Red de Caños y esteros poco alterados que se continúan con cordones dunares y playas que dan lugar a un espacio de gran interés paisajístico. Las unidades ambientales representativas del Parque Bahía de Cádiz son: medio marino, planicies intermareales, marisma (alta, media y baja), caños y sus orillas, salinas, ecotono marisma-sistemas dunares, playas y sistemas dunares y pinar. |
| Salinas de los ríos San Pedro y Guadalete | Marismas Transformadas | 1000 Ha. | |
| Marismas de los Toruños y playa de Levante | Complejos litorales de interés ambiental | 750 Ha. | La influencia de los mares y un clima suave, de tipo mediterráneo, son las claves que determinan las especiales características ecológicas de este humedal. Zona de contacto entre medios marinos y terrestres y gracias a la fácil circulación de las aguas, con buena iluminación y abundantes nutrientes, se establece una gran diversidad de especies entre moluscos, crustáceos, peces y aves acuáticas. En las zonas litorales fangosas son abundantes las cañaillas, verdigones, almejas, camarones y cangrejos, también presentes en las salinas donde además se capturan los llamados "pescados de estero" : lenguados, lubinas, doradas, lisas, etc. |
| Isla del Trocadero | Paraje Natural | 630 Ha. | |
| Marisma del Trocadero | Zonas húmedas bien conservadas | 400 Ha. | |
| Salinas del Trocadero | Marismas Transformadas | 330 Ha. | |
| Marismas del fondo de la Bahía | | | |
| Salinas del Río Arillo y Sancti Petri | Marismas Transformadas | 5400 Ha. | |
| Marismas del Río Arillo | | | |
| Marismas de Sancti Petri | Paraje Natural | 170 Ha. | |
| Marismas de Zurraque | | | |

3.1.2.3. ESTACIONES DE MUESTREO

Debido a la morfología y gran extensión de la Bahía de Cádiz, se dispusieron 4 transectos radiales a la línea de costa y un transecto de recorrido longitudinal:

- Transecto C1.* Formado por cuatro estaciones, situadas equidistantes entre sí, desde el punto más exterior del saco externo de la bahía (C1A) hasta las proximidades de la playa de Vistahermosa (El Puerto de Santa María) C1C. La estación C1D se corresponde con una zona donde aflora la pluma de vertidos de aguas residuales depuradas procedentes de la EDAR "La Galera" (El Puerto de Santa María).
- Transecto C2.* Constituido por tres estaciones de muestreo, este transecto se sitúa desde un punto exterior de la bahía (C2A) hasta las proximidades de la playa de Valdelagrana (El Puerto de Santa María) y desembocadura del Río Guadalete.
- Transecto C3.* Este transecto se sitúa en el estrecho de Puntales, cubriendo todo lo que es el límite que separa el saco externo del saco interno de la bahía.
- Transecto C4.* Este transecto se sitúa en el saco interno de la bahía. Debido a la poca profundidad media de este área (~2 m), el transecto se hizo coincidir con el canal de entrada de barcos (~10 m de media de profundidad) hasta el muelle de Puerto Real. Sólo consta de dos estaciones C4A y C4B.
- Transecto C5.* Este es un transecto aproximadamente perpendicular al resto de transectos. Está formado por estaciones de muestreo de especial interés ambiental, destacando las estaciones C5A correspondiente a la desembocadura del Río Guadalete, C5E correspondiente a la zona de dársenas de una industria naval (arsenal de La Carraca en San Fernando), y C5F correspondiente al punto de vertido de las aguas residuales sin depurar de la ciudad de San Fernando. El resto de estaciones de este transecto se corresponden con estaciones intermedias a C1, C2, C3 y C4.

3.1.2.4. PLANIFICACIÓN Y TOMA DE MUESTRA EN LA BAHÍA DE CÁDIZ

En la Bahía de Cádiz se realizaron 4 muestreos a lo largo de los años 1999 y 2000 en las estaciones climatológicas de invierno y verano.

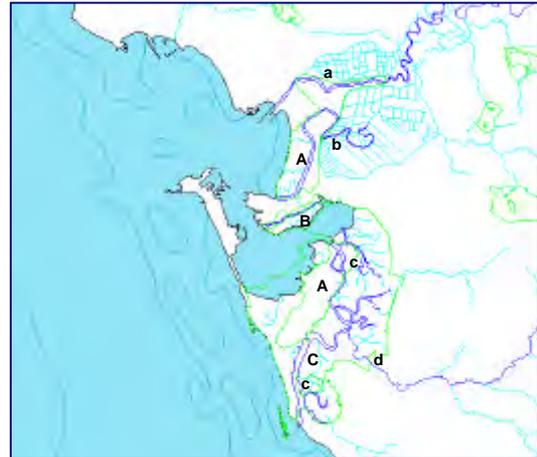
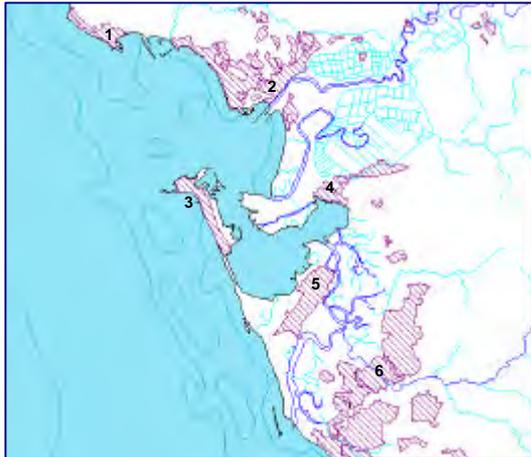
Previamente a los muestreos, sobre una carta náutica se seleccionaron los transectos y la localización aproximada (latitud y longitud) de las estaciones de muestreo. En el caso de la Bahía de Cádiz, la orientación y distribución de transectos se realizó fundamentalmente en función de la morfología de la bahía. La aproximación a las estaciones y la toma de muestra se hizo desde la embarcación AMA VI perteneciente a la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, excepto en la estación C5F (Puente Zuazo) la cual no es accesible por barco y por tanto se realizó la toma de muestra desde tierra.

Una vez en la zona de estudio, se corrigió la posición de los transectos y las estaciones de muestreo con objeto de obtener muestras en zonas de especial interés, o para adaptar los transectos a la morfología de la bahía y al calado (fundamentalmente C4). Las localizaciones corregidas se almacenaron en un GPS para así realizar la toma de los diferentes muestreos en las mismas estaciones seleccionadas. La tabla C II.9. muestra la localización y codificación definitiva de las estaciones.

Las muestras líquidas se tomaron a distintas profundidades empleando una botella muestreadora tipo Ruttner de 2 L de capacidad. En cada estación de muestreo, se tomó muestra a tres profundidades, excepto en aquellas estaciones en las que la profundidad es tan escasa que sólo se tomaron en una o dos profundidades.

De cada profundidad se separó una alícuota y se almacenó en frascos estériles para el posterior estudio microbiológico, mientras que con el agua restante se preparó una muestra compuesta representativa de la columna de agua. Finalmente se obtuvo una muestra compuesta representativa de cada transecto formada por la mezcla de volúmenes iguales de agua representativa de cada estación de muestreo. De forma paralela a la toma de muestras y para todas las profundidades, se realizaron medidas in situ de pH y temperatura.

Mapa C II.2.
Bahía de Cádiz. Principales núcleos urbanos y zonas protegidas. Transectos de muestreo



POBLACIONES

- 1. –Rota
- 2. –El Puerto de Santa María
- 3. –Cádiz
- 4. –Puerto Real
- 5. –San Fernando
- 6. –Chiclana de la Frontera

- Núcleos urbanos
- Espacios Naturales
- Hidrología principal
- Hidrología secundaria
- Transectos de muestreo

ESPACIOS NATURALES PROTEGIDOS

- A. Parque Natural –Bahía de Cádiz
- B. Paraje natural –Isla del Trocadero
- C. Paraje natural –Marismas de Sancti Petri

HIDROLOGÍA PRINCIPAL

- a. –Río Guadalete
- b. –Río San Pedro
- c. –Caño Sancti Petri
- d. –Río Iro

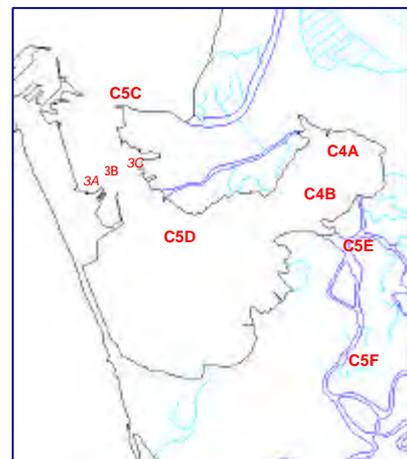
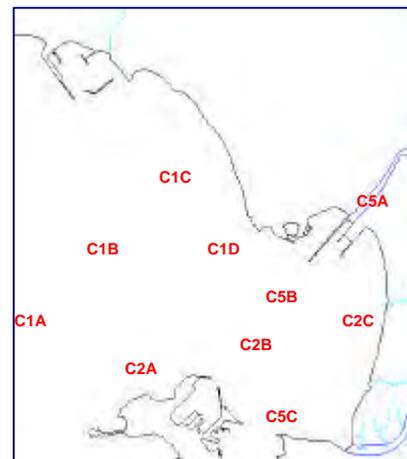
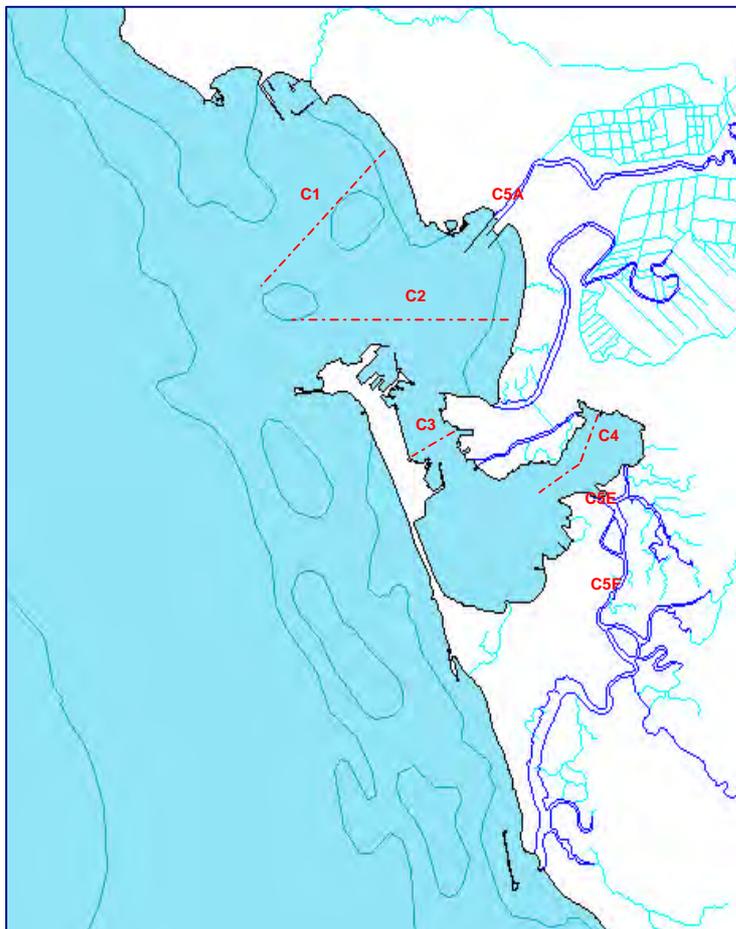


Tabla C II.9.
Datos relativos al muestreo en la Bahía de Cádiz.

| Transecto | Muestra | Profundidad total de la columna de agua | Localización geográfica | | Submuestras | Profundidad de muestreo |
|-----------|---------|---|-------------------------|-----------------|-------------------------|-------------------------|
| | | | Latitud | Longitud | | |
| C1 | C1A | 16,7 m | N 36° 33, 882' | W 006° 18, 879' | C1A-a C1A-b C1A-c | 1 m 7,5 m 15 m |
| | C1B | 13 m | N 36° 34, 806' | W 006° 17, 268' | C1B-a C1B-b C1B-c | 1 m 6 m 12 m |
| | C1C | 9,2 m | N 36° 35, 195' | W 006° 16, 635' | C1C-a C1C-b C1C-c | 1 m 4 m 8 m |
| | C1D | 7,6 m | N 36° 34, 733' | W 006° 16, 038' | C1D-a C1D-b C1D-c | 1 m 3 m 6 m |
| C2 | C2A | 3,8 m | N 36° 33, 399' | W 006° 13, 773' | C2A-a C2A-b | 1 m 2 m |
| | C2B | 9,3 m | N 36° 33, 217' | W 006° 16, 235' | C2B-a C2B-b C2B-c | 1 m 4 m 8 m |
| | C2C | 14,5 m | N 36° 33, 379' | W 006° 18, 423' | C2C-a C2C-b C2C-c | 1 m 7 m 13 m |
| C3 | C3A | 2,5 m | N 36° 30, 752' | W 006° 15, 929' | C3A-a | 1 m |
| | C3B | 9,4 m | N 36° 31, 003' | W 006° 15, 429' | C3B-a C3B-b C3B-c | 1 m 4 m 8 m |
| | C3C | 7 m | N 36° 31, 165' | W 006° 14, 956' | C3C-a C3C-b C3C-c | 1 m 3 m 6 m |
| C4 | C4A | 6,1 m | N 36° 31, 311' | W 006° 12, 241' | C4A-a C4A-b C4A-c | 1 m 3 m 5 m |
| | C4B | 3,3 m | N 36° 31, 474' | W 006° 11, 449' | C4B-a | 1 m |
| C5 | C5A | 4,5 m | N 36° 36, 010' | W 006° 13, 250' | C5A-a C5A-b | 1 m 3 m |
| | C5B | 14,1 m | N 36° 31, 947' | W 006° 15, 821' | C5B-a C5B-b C5B-c | 1 m 7 m 13 m |
| | C5C | 10,3 m | N 36° 30, 512' | W 006° 14, 920' | C5C-a C5C-b C5C-c | 1 m 4 m 9 m |
| | C5D | 16,2 m | N 36° 30, 078' | W 006° 14, 378' | C5D-a C5D-b C5D-c | 1 m 7 m 15 m |
| | C5E | 5,8 m | N 36° 29, 559' | W 006° 10, 771' | C5E-a C5E-b C5E-c | 1 m 2,5 m 5 m |
| | C5F | 1 m | | | C5F-a | 1 m |

3.1.3. ESTUARIO DEL RÍO IRO

3.1.3.1. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

EL Río Iro es un cauce fluvial afectado fuertemente por el reflujo de las mareas antes de su desembocadura en el caño de Sancti-Petri. En la cabecera del río recibe las aguas procedentes de las escorrentías agrícolas de la zona. En la zona de influencia mareal, cruza el municipio de Chiclana de la Frontera recibiendo los vertidos de las aguas residuales tratadas de una población de 60000 habitantes. Esta agua se distribuye por el sistema de caños llegando a formar parte del agua de abastecimiento de varias instalaciones dedicadas a la acuicultura. En su confluencia con el caño Sancti-Petri, las aguas del Río Iro se mezclan con las aguas procedentes de todo el sistema de marismas que conforman el Parque Natural Bahía de Cádiz. En la zona próxima a la desembocadura del caño en el océano atlántico existen importantes núcleos residenciales y turísticos e instalaciones de recreo y deportes náuticos cuyas actividades pueden verse afectadas por la calidad de las aguas proveniente del sistema de marismas.

El Río Iro y su entorno pertenecen al Parque Natural Bahía de Cádiz por lo que les son de aplicación tanto las directrices recogidas en el Plan de Ordenación de los Recursos Naturales como en el Plan Rector de Uso y Gestión de dicho Parque Natural.

En relación a su circulación, el río tiene una fuerte influencia mareal, de tal manera que el flujo de agua depende mucho más del movimiento de las mareas que de los aportes de agua dulce provenientes de su cuenca.

3.1.3.2. NÚCLEOS URBANOS, VERTIDOS CATALOGADOS, ZONAS PROTEGIDAS

Núcleos urbanos

El núcleo urbano que afecta principalmente el ecosistema estuárico del Río Iro es el municipio de Chiclana de la Frontera (Cádiz) de 61028 habitantes (datos tomados de la página web del Instituto Nacional de Estadística, año 2001). El tramo de río que cruza la población es un tramo importante puesto que coincide con la zona de mayor grado de mezcla entre las aguas provenientes de la cabecera y las aguas típicamente marinas provenientes del sistema de marismas de Sancti Petri. En el límite de la población, el río recibe un importante vertido procedente de la EDAR "El Torno" la cual trata gran parte de las aguas residuales e industriales de Chiclana.

El municipio de Chiclana de la Frontera ha crecido rápidamente en los últimos años. En verano, esta población puede verse duplicada debido a una de las actividades más importantes de la población en los últimos años: el turismo. El aumento de población en épocas estivales hace que consecuentemente, se produzca un incremento importante de la carga contaminante que recibe el estuario del Río Iro.

Vertidos catalogados

Los vertidos que afectan directamente al Río Iro y al tramo del caño Sancti Petri comprendido desde la desembocadura del río hasta el poblado de Sancti Petri son los siguientes:

Tabla C II.10.a. Datos relativos al Río Iro. Número y tipo de vertidos catalogados (Junta de Andalucía, 1996)

| Tipo de vertido | Número | Tamaño del vertido | Número | Situación administrativa | Número |
|----------------------------------|--------|---------------------------------|----------------|--------------------------|--------|
| Doméstica (separativa) | 3 | > 1000 m ³ /día | 0 industriales | No Autorizados | 10 |
| Pluviales (separativa) | 3 | | 1 urbanos | | |
| Doméstica + pluviales (unitaria) | 6 | < 1000 m ³ /día | 0 industriales | Autorizados | 4 |
| Agropecuaria | 0 | | 12 urbanos | | |
| Industrial | 0 | No activo o de forma esporádica | 1 | En trámite | |
| Otros | 2 | | | | |

Zonas protegidas

En la zona de estudio y alrededores se encuentra una gran número de zonas de especial interés ambiental catalogadas con diferentes figuras de protección según la Ley 2/89 de la Comunidad Andaluza sobre espacios protegidos (LEPA). Estas son las siguientes:

Tabla C II.10.b. Resumen de zonas protegidas situadas en el entorno del Río Iro (Sales y López-Aguayo, 1996)

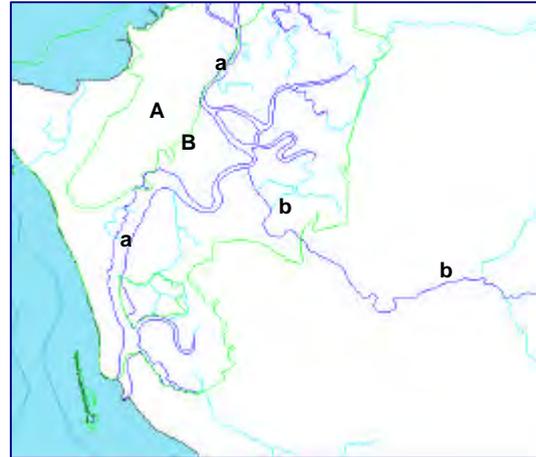
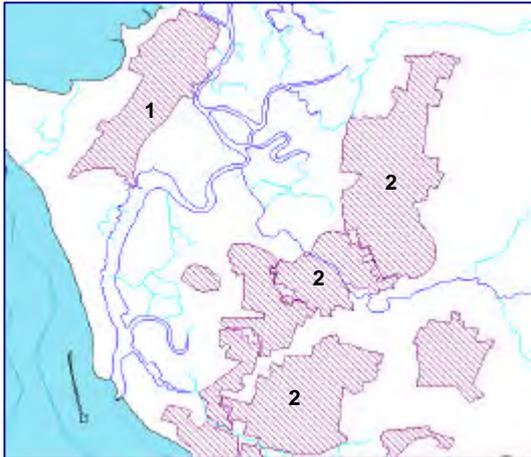
| Denominación del espacio | Figuras de protección según la LEPA | Extensión | Descripción y otras observaciones |
|--------------------------|-------------------------------------|-----------|--|
| Bahía de Cádiz | Parque Natural | 10000 Ha. | Ver descripción de las zonas protegidas en la Bahía de Cádiz |
| Marismas de Sancti Petri | Paraje Natural | 170 Ha. | |

3.1.3.3. ESTACIONES DE MUESTREO

Debido a la morfología aproximadamente lineal del estuario y a la pequeña anchura del cauce, se dispuso un único transecto longitudinal formado por 8 estaciones de muestreo, mas una estación exterior localizada en la playa de Sancti Petri la cual se ha considerado como estación de referencia para el análisis de resultados que se realizará posteriormente.

Del conjunto de estaciones seleccionadas a lo largo del río, se pueden distinguir dos grupos de estaciones. El primer grupo lo formarían las estaciones I1 a I4 próximas al vertido de las aguas tratadas de la estación depuradora de *El Torno*. Las estaciones I1 y I2 se localizan aguas arriba del vertido pero están muy influenciados por éste debido al efecto de la marea. La estación I3 se localiza en el punto de mezcla del vertido con las aguas del estuario y la estación I4 se sitúa aguas abajo, antes de un pequeño recodo que hace el río. El segundo grupo lo formarían las estaciones I5 a I7. La estación I5 se localiza al otro lado del recodo y las estaciones I6 a I7 en el tramo lineal. La estación I8 se encuentra en el punto de mezcla de las aguas del Río Iro con las aguas del caño Sancti Petri.

Mapa C II.3.
Río Iro. Principales núcleos urbanos y zonas protegidas. Estaciones de muestreo



POBLACIONES

- 1. –San Fernando
- 2. –Chiclana de la Frontera



Núcleos urbanos



Espacios Naturales



Hidrología principal



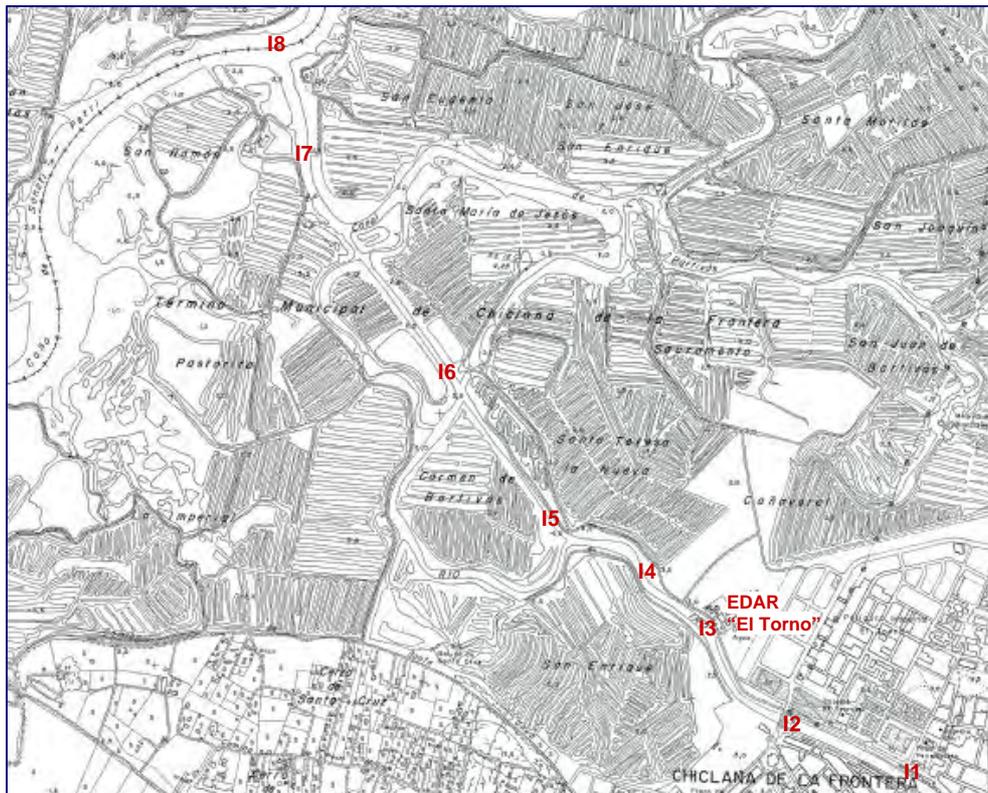
Hidrología secundaria

ESPACIOS NATURALES PROTEGIDOS

- A. Parque Natural –Bahía de Cádiz
- B. Paraje natural –Marismas de Sancti Petri

HIDROLOGÍA PRINCIPAL

- a. Caño Sancti Petri
- b. –Río Iro



3.1.3.4. PLANIFICACIÓN Y TOMA DE MUESTRA EN EL RÍO IRO

La toma de muestra se realizó coincidiendo con la marea alta con objeto de poder realizar la toma desde una embarcación neumática. La toma se realizó en el centro de la corriente de forma manual sumergiendo los recipientes a 0,5 m de la superficie. En cada estación de muestreo se tomó muestra para análisis físico-químico, y para análisis microbiológico en recipiente esterilizado en autoclave. Sobre las muestras para análisis físico-químico, se realizaron medidas de pH, temperatura y oxígeno disuelto.

Respecto a la localización de las estaciones, al ser un cauce estrecho transversalmente, fue posible tomar referencias a tierra con objeto de localizar las estaciones de toma de muestra.

3.1.4. BAHÍA DE ÁLGECIRAS

3.1.4.1. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO

La Bahía de Algeciras se encuadra en la comarca del campo de Gibraltar. Esta comarca es una de las zonas más industrializadas de la provincia de Cádiz y en ella se sitúa uno de los tejidos productivos más importantes de Andalucía. Los núcleos urbanos más importantes son los municipios de Algeciras, Los Barrios, San Roque y La Línea de la Concepción, todos ellos con una elevada relación con la Bahía de Algeciras en cuyos márgenes se concentra una intensa actividad industrial y portuaria.

3.1.4.2. NÚCLEOS URBANOS, VERTIDOS CATALOGADOS, ZONAS PROTEGIDAS

Núcleos urbanos

En la Bahía de Algeciras se localizan varios núcleos urbanos importantes: Algeciras, San Roque, Los Barrios (situado más al norte), La línea de la Concepción y Gibraltar. De menor importancia y sin carácter de municipio tenemos los núcleos de Palmones, Guadarranque, Puente Mayorga, Bonares y Campillo.

Tabla C II.12.a. Datos relativos a la Bahía de Algeciras. Núcleos urbanos y población

| Población | Nº Habitantes -Instituto Nacional de Estadística, 2001- |
|---------------------------|--|
| Algeciras | 101468 |
| La Línea de la Concepción | 59437 |
| Los Barrios | 17737 |
| San Roque | 23436 |
| Gibraltar | ~27000 |
| 229078 habitantes | |

Vertidos catalogados

Los vertidos catalogados en la Bahía de Algeciras son los que se presentan en la siguiente tabla. Destacar que las poblaciones ribereñas no poseen estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas en la actualidad.

Tabla C II.12.b. Datos relativos a la Bahía de Algeciras. Número y tipo de vertidos catalogados (Junta de Andalucía, 1996)

| Tipo de vertido | Número | Tamaño del vertido | Número | Situación administrativa | Número |
|----------------------------------|--------|---------------------------------|----------------|--------------------------|--------|
| Doméstica (separativa) | 2 | > 1000 m ³ /día | 8 industriales | No Autorizados | 26 |
| Pluviales (separativa) | 6 | | 6 urbanos | | |
| Doméstica + pluviales (unitaria) | 23 | < 1000 m ³ /día | 5 industriales | Autorizados | 23 |
| Agropecuaria | | | 22 urbanos | | |
| Industrial | 18 | No activo o de forma esporádica | 8 | En trámite | |
| Otros | | | | | |

Zonas protegidas

Próxima a la Bahía de Algeciras, sólo existe un espacio protegido según la Ley 2/89 de la Comunidad Andaluza sobre espacios protegidos (LEPA: Ley de Espacios Protegidos de Andalucía).

Tabla C II.12.c. Resumen de zonas protegidas situadas en la Bahía de Algeciras (Sales y López-Aguayo, 1996)

| Denominación del espacio | Figuras de protección según la LEPA | Extensión | Descripción y otras observaciones |
|--------------------------|-------------------------------------|-----------|--|
| Marismas del Palmones | Paraje Natural | 58 Ha. | Llanura aluvial con origen en los aportes sedimentarios del Río Palmones. Vegetación halófila compuesta por juncos, Salicornia, carrizo, espartina y limonios. Comunidad de algas y moluscos en sedimento fangoso. Es una de las escasas zonas húmedas que restan en la Bahía de Algeciras. Actividad industrial y vertedero incontrolado en las cercanías y de caza y pesca en su interior. |

3.1.4.3. ESTACIONES DE MUESTREO

Con objeto de realizar una evaluación completa de la Bahía de Algeciras y considerando su morfología, dimensiones y la gran influencia que ejercen las desembocaduras de los ríos Guadarranque y Palmones, se han dispuesto tres grandes transectos longitudinales los cuales se describen a continuación.

- Transecto AI 1.* Este transecto parte de las proximidades de la desembocadura del Río Palmones y se prolonga en dirección Norte-Sur hasta las proximidades de Punta Carnero. Es un transecto que se sitúa paralelamente a la morfología del puerto comercial y deportivo de Algeciras. Consta de 5 estaciones de muestreo.
- Transecto AI 2.* Es el transecto central de la bahía. Comienza en la estación AI 2A situada entre las desembocaduras de los ríos Palmones y Guadarranque y se prolonga en un total de 9 estaciones hasta la estación AI 2I la cual es la estación más exterior del sistema y por tanto sería la estación de referencia de esta gran zona ambiental. La estación AI 2A coincide con el punto de dilución del vertido de una importante empresa de la zona. A efectos de no distorsionar los resultados de todo el transecto, no se han computado los resultados de esta estación para obtener los resultados promedios.
- Transecto AI 3.* El tercer transecto parte de la desembocadura del Río Guadarranque y se sitúa aproximadamente paralelo a la orilla derecha de la bahía hasta llegar muy próximo a Punta Europa. En este transecto se sitúan cinco estaciones de muestreo.

Mapa C II.4.
Bahía de Algeciras. Principales núcleos urbanos y zonas protegidas. Estaciones de muestreo

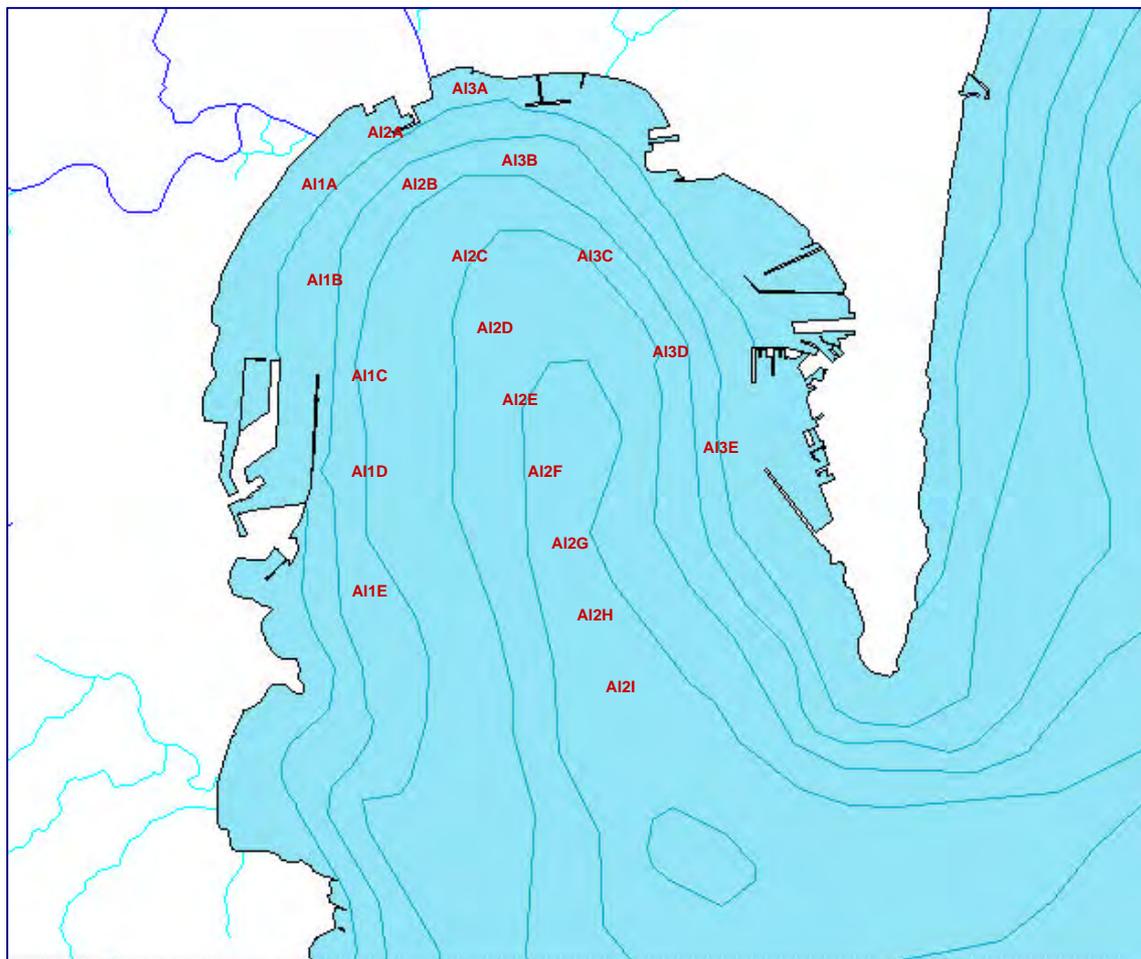
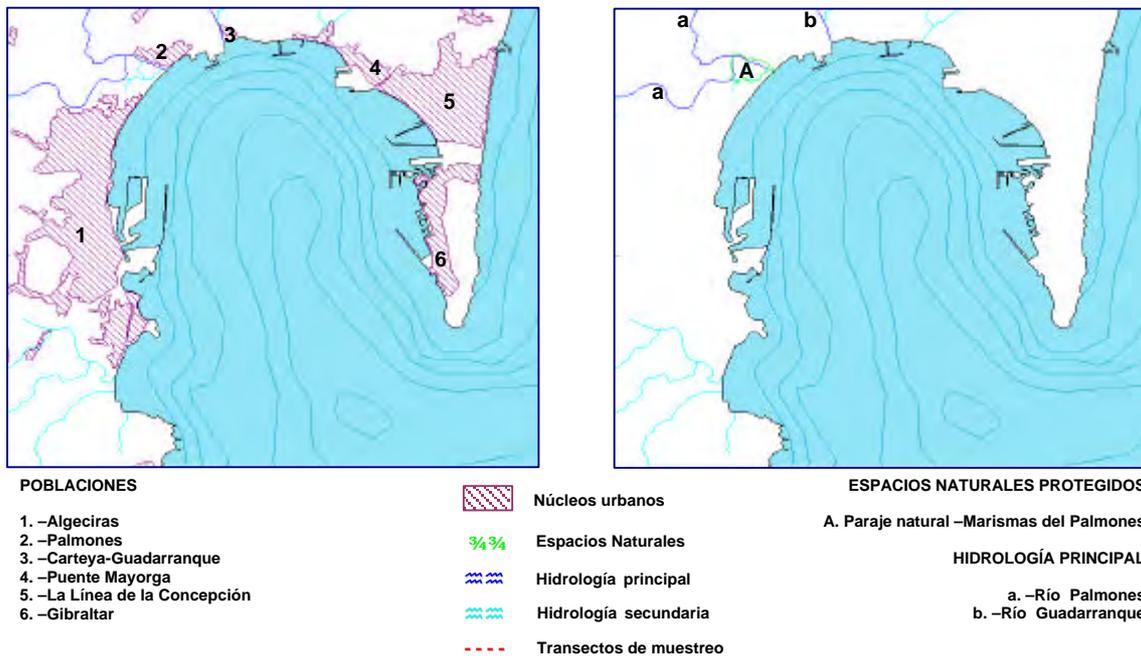


Tabla C II.13.
Datos relativos al muestreo en la Bahía de Algeciras.

| Transecto | Muestra | Localización geográfica | | Submuestras | Profundidad de muestreo |
|-----------|---------|-------------------------|------------------|--------------------|-------------------------|
| | | Latitud | Longitud | | |
| AI 1 | AI 1A | N 36° 10' 14,1'' | W 005 25' 38,0'' | AI 1A-a AI 1A-b | 1 m 10 m |
| | AI 1B | N 36° 10' 32,4'' | W 005 25' 21,6'' | AI 1B-a AI 1B-b | 1 m 10 m |
| | AI 1C | N 36° 10' 6,6'' | W 005 25' 27'' | AI 1C-a AI 1C-b | 1 m 10 m |
| | AI 1D | N 36° 09' 38,4'' | W 005 25' 32,4'' | AI 1D-a AI 1D-b | 1 m 10 m |
| | AI 1E | N 36° 08' 6'' | W 005 25' 39,0'' | AI 1E-a AI 1E-b | 1 m 10 m |
| AI 2 | AI 2A | N 36° 10' 30,6'' | W 005 25' 23,3'' | AI 2A-a AI 2A-b | 1 m 10 m |
| | AI 2B | N 36° 10' 6,1'' | W 005 25' 18,4'' | AI 2B-a AI 2B-b | 1 m 10 m |
| | AI 2C | N 36° 08' 6'' | W 005 25' 38,0'' | AI 2C-a AI 2C-b | 1 m 10 m |
| | AI 2D | N 36° 09' 41,4'' | W 005 25' 3,5'' | AI 2D-a AI 2D-b | 1 m 10 m |
| | AI 2E | N 36° 09' 15,2'' | W 005 24' 41,9'' | AI 2E-a AI 2E-b | 1 m 10 m |
| | AI 2F | N 36° 06' 34,9'' | W 005 23' 53,6'' | AI 2F-a AI 2F-b | 1 m 10 m |
| | AI 2G | N 36° 07' 1'' | W 005 24' 3,9'' | AI 2G-a AI 2G-b | 1 m 10 m |
| | AI 2H | N 36° 07' 49,4'' | W 005 24' 10,9'' | AI 2H-a AI 2H-b | 1 m 10 m |
| | AI 2I | N 36° 08' 39'' | W 005 25' 16,8'' | AI 2I-a AI 2I-b | 1 m 10 m |
| AI 3 | AI 3A | N 36° 10' 22,8'' | W 005 24' 50,8'' | AI 3A-a AI 3A-b | 1 m 10 m |
| | AI 3B | N 36° 07' 3,8'' | W 005 22' 50,3'' | AI 3B-a AI 3B-b | 1 m 10 m |
| | AI 3C | N 36° 07' 30,5'' | W 005 22' 46,0'' | AI 3C-a AI 3C-b | 1 m 10 m |
| | AI 3D | N 36° 08' 6,6'' | W 005 22' 53,3'' | AI 3D-a AI 3D-b | 1 m 10 m |
| | AI 3E | N 36° 09' 10,8'' | W 005 23' 33,4'' | AI 3E-a AI 3E-b | 1 m 10 m |
| | AI 3F | N 36° 10' 22,8'' | W 005 24' 50,8'' | AI 3F-a AI 3F-b | 1 m 10 m |

3.1.4.4. PLANIFICACIÓN Y TOMA DE MUESTRA EN LA BAHÍA DE ALGECIRAS

En la Bahía de Algeciras se realizaron un total de ocho muestreos distribuidos a lo largo del año 2000.

Previamente a los muestreos, sobre una carta náutica se seleccionaron los transectos y la localización aproximada (latitud y longitud) de las estaciones de muestreo. En el caso de la Bahía de Algeciras, la orientación y distribución de transectos se realizó fundamentalmente en función de la morfología de la bahía disponiéndolos de forma radial y tomando como zona origen, la zona de mezcla con la bahía de las aguas procedentes de los ríos Palmones y Guadarranque. La aproximación a las estaciones y la toma de muestra se hizo mediante una embarcación neumática.

Una vez en la zona de estudio, se corrigió la posición de los transectos y las estaciones de muestreo. Se anotaron las coordenadas GPS de cada estación de muestreo con objeto de realizar la toma de los diferentes muestreos en las mismas estaciones seleccionadas. La tabla C II.13. muestra la localización y codificación definitiva de las estaciones.

Debido a la gran profundidad de columna de agua que presentaban la gran mayoría de las estaciones de muestreo seleccionadas (> 50 metros), no fue posible obtener muestras a diferentes profundidades con objeto de tener una muestra representativa de toda la columna de agua por lo que se optó por tomar agua sólo a dos profundidades, una muestra superficial a 0,5 m de la superficie y una muestra a 10 metros. Estas muestras se obtuvieron con una botella muestreadora tipo Ruttner de 1 L de capacidad.

De cada profundidad se separó una alícuota y se almacenó en frascos estériles para el posterior estudio microbiológico, mientras que con el agua restante se preparó una muestra compuesta representativa de la columna de agua, formada por la mezcla de volúmenes iguales de cada profundidad. De forma paralela a la toma de muestras se realizaron medidas in situ de pH, temperatura y oxígeno disuelto.

3.2. SELECCIÓN DE PARÁMETROS DE VIGILANCIA AMBIENTAL

Puesto que es imposible analizar cada uno de los compuestos potencialmente presentes en las áreas de estudio, se ha realizado una selección basado en los siguientes criterios:

- Relevancia ambiental del parámetro.
- Selección de estos parámetros (uno o varios) y seguimiento por otros autores/organismos en las zonas de estudio (artículos de investigación, informes medioambientales de la Consejería de Medio Ambiente, otros).
- Relevancia del parámetro por su aparición reiterativa en diferentes normativas.
- Parámetro indicador de procesos de contaminación.
- Facilidad de análisis.

La siguiente tabla muestra el listado de parámetros:

Tabla C II.14.
Parámetros seleccionados para la evaluación de la calidad ambiental de las zonas de estudio.

| <i>Tipo de parámetros</i> | <i>Parámetros</i> | <i>Zonas de estudio</i> |
|---------------------------|--|---|
| MICROBIOLOGÍCOS | Coliformes fecales Estreptococos fecales | R. Huelva; B. Cádiz; R. Iro; B. Algeciras R. Huelva; B. Cádiz; R. Iro; B. Algeciras |
| FÍSICO-QUÍMICOS | Amonio Carbono orgánico total Dureza cálcica Fenoles Fosfatos Fósforo total Grasas y aceites Nitratos Nitritos Oxígeno disuelto pH Pigmentos fotosintéticos Salinidad Silicatos Sólidos en suspensión Sólidos volátiles Temperatura Tensioactivos aniónicos | R. Huelva; B. Cádiz; R. Iro; B. Algeciras R. Huelva; B. Cádiz; R. Iro; B. Algeciras R. Huelva; B. Cádiz; R. Iro R. Huelva; B. Cádiz; R. Iro R. Huelva; B. Cádiz; R. Iro; B. Algeciras R. Huelva; B. Cádiz; R. Iro; B. Algeciras R. Huelva; B. Cádiz R. Huelva; B. Cádiz; R. Iro; B. Algeciras R. Huelva; B. Cádiz; R. Iro; B. Algeciras R. Iro; B. Algeciras R. Huelva; B. Cádiz; R. Iro; B. Algeciras R. Huelva; B. Cádiz |
| METALES PESADOS | Cadmio Cobre Plomo Zinc | R. Huelva; B. Cádiz R. Huelva; B. Cádiz R. Huelva; B. Cádiz R. Huelva; B. Cádiz |

3.3. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Debido a la complejidad que presenta el análisis de muestras de aguas marinas, ha sido necesario consultar, adaptar y calibrar los métodos analíticos a la matriz salina de las aguas de estudio. Para la gran mayoría de los parámetros, las técnicas de análisis son las recomendadas en diferentes libros y manuales especializados en análisis en agua de mar:

- 📖 APHA-AWWA-WPCF (1992). Métodos normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. Ed. Díaz de Santos.
- 📖 Gaudette, H.E.; Flight, W.R.; Toner, L.; Folger, D.W. (1974). An inexpensive titration method for the determination of organic carbon in recent sediments. *J. Sediment. Petrol.* 44: 249-253.
- 📖 Grasshoff, W.K.; Weinheim, K.; Ehrhasrdt, M.; Krempling, K. (eds.) (1983). *Methods of seawater analysis. Second, Revised and Extended Edition.* Editorial Verlag Chemie,.
- 📖 Intergovernmental Oceanographic Commission (1983). *Chemical methods for use in marine environmental monitoring.* Unesco
- 📖 Parson, T.R.; Meita, Y.; Colli, C.M. (1989). *Manual of Chemical and Biological Methods for seawater analysis.*
- 📖 Rodier (1992). *Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar.* Ed. Omega, Barcelona.

En el Anexo I del presente documento se incluye una breve descripción de la técnica de análisis utilizada para cada parámetro, procedimiento de calibración y límite de detección obtenido.

3.4. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE DATOS

En los estudios de evaluación de la calidad ambiental de cuerpos de aguas se obtiene un gran conjunto de datos los cuales frecuentemente son difíciles de interpretar (Dixon y Chiswell, 1996) siendo la tendencia general la del análisis individualizado basándonos tradicionalmente en la evolución estacional o espacial de estas variables.

En los últimos años, cada vez son más los trabajos de evaluación ambiental que incluyen estudios basados en el análisis exploratorio de datos como herramienta en el tratamiento de datos analíticos y ambientales (Brown et al., 1994, 1996; Vega et al., 1998; Del Valls, 1998). Mediante estas técnicas se consigue tener una mejor visión del comportamiento de las variables y en la mayoría de los estudios, una reducción del conjunto de datos y su interpretación en función de multiconstituyentes químicos y medidas físicas (Massart et al., 1988; Chapman *et al.*, 1992; Wenning y Erickson, 1994; Vega et al. 1998; Del Valls, 1998; Wunderlin et al., 2001).

El análisis exploratorio de datos (Exploratory Data Analysis: EDA) se utiliza para identificar relaciones entre variables sin que se hayan hecho suposiciones previas acerca de cómo pueden ser estas relaciones. En un proceso típico de análisis exploratorio de datos, se consideran un gran conjunto de variables y se comparan usando diversas técnicas con el objeto de encontrar patrones sistemáticos de comportamiento.

Entre los métodos que se suelen utilizar en el EDA se consideran desde un simple estudio estadístico de las variables hasta técnicas multivariantes diseñadas para identificar patrones dentro de un conjunto de datos.

Los métodos exploratorios de estadística básica incluyen fundamentalmente técnicas para determinar la distribución de las variables (distribución normal, o no-normal, patrones bimodales, etc.), matrices de correlación entre variables y tablas y/o histogramas de frecuencia.

Las técnicas exploratorias multivariantes se utilizan específicamente para identificar patrones en conjuntos multivariantes de datos. Entre estas técnicas cabe destacar el análisis cluster y el análisis factorial.

Para la evaluación de las zonas de estudio se han seleccionado diversas técnicas de análisis de datos. Esta selección se ha basado en dos fuentes principales:

- ▣ Pautas establecidas por la USEPA (USEPA, 1998) en sus procedimientos para la Evaluación de la Calidad de Datos (Data Quality Assessment, DQA).
- ▣ Bibliografía científica citada en este apartado.

Si bien podemos encontrar una revisión detallada de todas estas técnicas de análisis en Johnson y Wichern (1992), Adams (1998) y Otto (1998) así como en diversos artículos de reciente publicación, en los apartados siguientes se resumirán las técnicas de análisis y de representación gráfica seleccionadas para las variables de estudio, así como los objetivos que se pretenden conseguir con ellas.

3.4.1. EVALUACIÓN PRELIMINAR DEL CONJUNTO DE DATOS

Una evaluación preliminar del conjunto de datos se realiza mediante el cálculo de algunos parámetros estadísticos básicos y realizar un examen de los datos mediante representaciones gráficas. Para ellos se realizarán:

- ☑ Cálculo de algunos parámetros estadísticos básicos (media, mediana, percentiles, rango y desviación estándar. Este análisis permite identificar valores anómalos que pueden influir en el análisis de datos
- ☑ Representaciones gráficas de los datos con el objeto de establecer patrones de comportamiento y relaciones entre las variables, confirmar o rechazar hipótesis, e identificar problemas potenciales

3.4.1.1. CÁLCULO DE CANTIDADES ESTADÍSTICAS BÁSICAS

El objetivo de estas operaciones es resumir algunas características cuantitativas del conjunto de datos usando técnicas estadísticas comunes. Algunos de los parámetros más útiles son: número de observaciones, medidas de tendencia central como la media, la mediana y la moda; medidas de dispersión como el rango, la varianza, la desviación estándar, coeficiente de variación, o el rango intercuartil; medidas de validez relativa como los percentiles; medidas de simetría o forma de la distribución; y medidas de asociación entre dos o más variables como son las correlaciones (éstas últimas se tratarán en un apartado individual).

3.4.1.1.1. Medidas de validez relativa

Algunas veces es interesante conocer la posición relativa de una o varias observaciones en relación al conjunto global de las observaciones. Para ello se utilizan los percentiles. Un percentil es el valor de la variable considerada que es mayor o igual que un porcentaje p de los valores que toma la variable en el conjunto de datos, y es menor o igual que un porcentaje $(1-p)$ de los valores. Entre los percentiles más utilizados son los cuartiles que son los percentiles 25%, 50% y 75%. El percentil 50% coincide con la mediana y los percentiles 25% y 75% se utilizan para estimar la dispersión de los datos. En el caso de datos ambientales también es interesante considerar los percentiles 90%, 95% o 99%. Estos últimos se utilizan en procesos de toma de decisión respecto a por ejemplo asegurar que el 90%, 95% y 99% de los niveles de contaminación se encuentran por debajo de un nivel prefijado de riesgo.

3.4.1.1.2. Medidas de tendencia central

Las medidas de tendencia central caracterizan el centro de una muestra de puntos. Las tres estimaciones más frecuentes son la media, mediana y la moda. Las más utilizadas son la media y la mediana.

La media es la medida más utilizada representando el "centro de gravedad" del conjunto de datos. Un problema que presenta esta medida es que está muy influenciada por valores altos y bajos así como por valores no detectados.

La mediana es la segunda medida más utilizada. El valor de la mediana coincide directamente con el valor del dato central cuando el conjunto de datos es ordenado de menor a mayor. El valor de la mediana no está influenciado por valores extremos y es muy útil en el caso de que existan valores anómalos y/o no detectados.

3.4.1.1.3. Medidas de dispersión

Las medidas de tendencia central son más significativas si van acompañados por información acerca de la distancia de los datos respecto al centro. Las medidas de dispersión incluyen el rango, la varianza, desviación estándar, coeficiente de variación y el rango intercuartil.

La medida más fácil es el rango de la muestra. Para muestras pequeñas, el rango es fácil de interpretar y puede representar la dispersión de datos. Para grandes muestras, el rango no es muy informativo ya que puede estar condicionado por valores extremos.

La varianza de la muestra mide la dispersión de los datos respecto a la media. Varianzas muy altas implican que existe una gran diferencia entre los datos y por tanto los datos no están agrupados entorno a la media. Varianzas pequeñas significan que los datos están agrupados entorno a la media. La varianza de la muestra está afectada por valores extremos y por un gran número de valores no detectados.

El coeficiente de variación es una medida adimensional que permite la comparación de la dispersión de todo el conjunto de datos. Suele utilizarse en aplicaciones ambientales ya que la variabilidad expresada como desviación estándar, frecuentemente es proporcional a la media.

Cuando existen valores extremos, el rango intercuartil puede ser más representativo de la dispersión de los datos que la desviación estándar. Este parámetro estadístico no está afectado por valores extremos y es muy útil cuando existe un gran número de valores no detectados.

3.4.1.2. REPRESENTACIONES GRÁFICAS DE LOS DATOS

El objetivo de estas representaciones es identificar patrones y tendencias en los datos que no se han detectado mediante métodos numéricos. Los gráficos se utilizan para identificar estas tendencias, confirmar o rechazar rápidamente frecuencias, descubrir fenómenos no detectados anteriormente, identificar problemas potenciales, y sugerir medidas correctivas. Estas representaciones pueden incluir el conjunto de datos, valores estadísticos, datos temporales, datos espaciales, y dos o más variables. Una única representación gráfica no proporciona información suficiente del conjunto de datos por lo que generalmente se deben representar varios tipos de gráficos (histogramas, diagramas de dispersión, representaciones box-whiskers, etc.). La DQA (USEPA, 1998) recomienda realizar al menos representaciones del conjunto de datos y representaciones de parámetros estadísticos. Si los datos presentan componentes estacionales y/o espaciales se recomienda seleccionar representaciones gráficas que reflejen estas variaciones. Si el conjunto de datos está formado por más de una variable, es conveniente tratar cada variable individualmente antes de realizar representaciones de múltiples variables. Si el plan de muestreo o los métodos de análisis recomendados presentan una suposición crítica, hay que considerar algún tipo de gráfico que permita validar estas suposiciones, por ejemplo, si un estudio depende mucho de la suposición de la normalidad, entonces es interesante incluir un gráfico que represente la probabilidad normal.

Para los datos obtenidos en las áreas de estudio las representaciones que se realizarán dentro de este apartado serán los histogramas de las variables, diagramas de datos ordenados (ranking data plot) y los diagramas de cajas-bigotes (box-whiskers).

3.4.1.2.1. Histogramas

La representación gráfica más frecuente para datos agrupados es el histograma. Para realizar la representación se divide el conjunto de datos en unidades de rangos y se cuenta el número de datos que están incluidos en cada unidad. El histograma se realiza representando en el eje de abscisas las unidades de rangos, y en el eje de ordenadas el número de observaciones mediante diagramas de barras.

Los histogramas proporcionan una manera de investigar la simetría y variabilidad de los datos. Si los datos son simétricos, la estructura de las barras deben ser simétricas respecto a un punto central. También indican si los datos presentan un sesgo y la dirección de éste.

Los histogramas proporcionan mucha información respecto a la estructura de los datos. En el caso de las variables físico-químicas analizadas nos van a permitir obtener información acerca de la forma de la distribución de los valores, los valores de mayor frecuencia y la simetría de la distribución.

3.4.1.2.2. Diagramas de datos ordenados

Un gráfico de datos ordenados es una representación gráfica muy útil y fácil de realizar y de interpretar y tiene la ventaja de que no hay que realizar suposiciones acerca del modelo de los datos. Este diagrama se basa en representar los datos ordenados y numerados desde el valor más pequeño hasta el valor más alto. Suele utilizarse para determinar la densidad de los datos, por ejemplo, si todos los valores se encuentran próximos a los valores centrales con pocos valores situados en las colas o si existe un gran número de valores en alguna de las colas, o puede que estén uniformemente distribuidos en todo el rango de valores. La densidad de los datos se muestra a través de la pendiente del gráfico. Así representaciones con una pendiente suave significa que el gráfico crece lentamente. Con un número pequeño de datos y una gran pendiente, el gráfico crece rápidamente.

Estos diagramas son útiles para determinar si los datos presentan sesgos o si son simétricos. En el caso de presentar sesgos hacia la derecha (valores altos) se extiende más alargadamente para luego crecer hacia arriba dando una apariencia de forma convexa (tipo a). En el caso de presentar sesgos hacia la izquierda (valores bajos) la curva se incrementa rápidamente en la zona más baja dándole al gráfico una forma cóncava (Tipo b). Si los datos son simétricos, entonces la zona superior del gráfico se estrecha en la esquina superior derecha de la misma forma que en la zona inferior el gráfico se estrecha hacia abajo y hacia la izquierda creando de esta forma un gráfico en forma de "s" (tipo c).

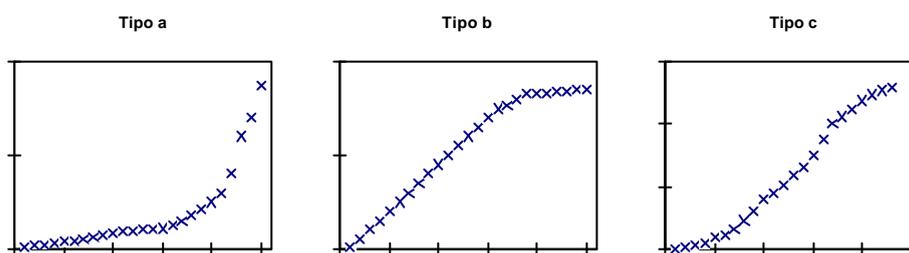


Figura C II.1. Diferentes formas que toman los diagramas de datos ordenados

3.4.1.2.3. Diagramas de box-whiskers

Las representaciones de box-whiskers (cajas-bigotes) son diagramas esquemáticos los cuales nos son útiles para visualizar parámetros estadísticos importantes de los datos.

La representación en cajas proporcionan una impresión visual de la localización y forma de la distribución de los resultados. Por ejemplo, cajas de grandes whiskers superiores indican que la distribución está inclinada hacia altas concentraciones. Las cajas de gran extensión indican variaciones estacionales de la composición del agua. Observando estas cajas también es posible percibir diferencias entre las estaciones de muestreo.

Una representación de box-whisker está compuesta por una caja central (box) marcada por un punto interior el cual representa la mediana. El fondo y la parte de arriba de la caja representan las localizaciones del primer y tercer cuartil (Q_1 y Q_3). Los whiskers o bigotes son las líneas que se extienden desde el fondo o desde la zona más alta de la caja hasta las observaciones más bajas y más altas de la

región definida por $Q_1 - 1,5(Q_3 - Q_1)$ y $Q_3 + 1,5(Q_3 - Q_1)$. Los puntos individuales son valores fuera de estos límites y se suelen representar como asteriscos o círculos.

La siguiente figura muestra un resumen de la representación de box-whiskers (StatSoft, 1997).

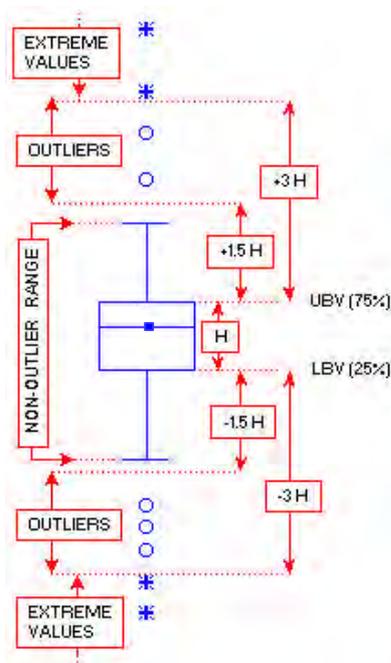


Figura C II.2.

Representación gráfica de un diagrama clásico de box-whiskers

UBV: Upper box value= percentil 75%

LBV: Lower box value= percentil 25%

o.c.: outlier coefficient= 1.5

El cuadrado de la caja central puede representar la media, la moda o la mediana

3.4.2. MEDIDAS DE ASOCIACIÓN DEL CONJUNTO DE DATOS

3.4.2.1. MATRICES DE CORRELACIÓN

Los datos generalmente incluyen medidas de diferentes características o variables en cada punto de muestreo y puede ser interesante conocer las relaciones o el nivel de asociación entre dos o más de estas variables. Una de las medidas de asociación más comunes es el coeficiente de correlación

Los coeficientes de correlación no implican causa-efecto. Puede decirse que la correlación entre dos variables es alta y la relación es fuerte, pero no puede afirmarse que una variable cause que otra se incremente o decrezca sin que exista una evidencia posterior y un control estadístico fuerte. Los coeficientes de correlación no detectan relaciones no lineales y por tanto deben usarse únicamente junto a diagramas de dispersión los cuales nos puedan mostrar que la relación es significativa o no. En caso contrario, deberían buscarse relaciones no-lineales.

En los siguientes apartados se ha incluido el análisis de correlación lineal de Pearson (r), de las diferentes variables incluidas en este estudio. La correlación de Pearson considera que se dispone de un intervalo de valores de dos variables y se determina en qué magnitud una de ellas es proporcional a la otra. Esta

correlación tiene la ventaja de que el valor de correlación o coeficiente de correlación no depende de las unidades de medida específicas, es decir, podemos correlacionar el pH con la concentración en mg/L de un determinado nutriente en el agua, con la salinidad, etc.

Las correlaciones son una medida de las relaciones lineales existentes entre dos o más variables. Para evaluar correctamente las correlaciones entre parámetros o variables, es muy importante conocer la "magnitud" y la "dirección", así como la significancia de la correlación. Los coeficientes de correlación oscilan entre +1,000 y -1,000. El valor de -1,000 representa una correlación negativa perfecta mientras que un valor de +1,000 representan una correlación positiva perfecta. Un valor de 0,000 representa la ausencia de correlación.

En relación a la significancia, para facilitar la identificación de estos coeficientes se han marcado los valores en estilo subrayado. No hay que olvidar que estos niveles de significancia son dependientes del tamaño de la muestra. Por ejemplo, en el caso de la Ría de Huelva, el tamaño de la muestra ha sido $N=66$ y se han marcado todos aquellos coeficientes cuyo nivel de significancia es $p < 0,05$.

Para la realización de las matrices de correlación se ha utilizado el paquete estadístico Statistica 6.0 (StatSoft Inc., 1997)

3.4.2.2. ANÁLISIS CLUSTER

El *análisis cluster* (Cluster Analysis: CA) o de *conglomerados* es una técnica multivariante que agrupa objetos (casos y/o variables) en clases (clusters), de esta forma, los objetos dentro de una clase son similares a los de su misma clase y diferentes al resto de objetos. Dependiendo de que los objetos sean variables o casos, se obtendrán *cluster de variables* o *cluster de casos*. Existen también técnicas de análisis cluster mixtas que agrupan simultáneamente a casos y variables, como es el caso del *block clustering*. El *cluster de casos* es el más utilizado, puesto que existen otras técnicas multivariantes más indicadas a la hora de buscar grupos homogéneos de variables.

Así pues, si como casos diferentes tenemos diferentes estaciones de muestreo, muestras de agua, áreas ambientales etc., el análisis cluster permitirá agrupar las muestras de agua basándose en las similitudes en su composición química (Chen, 1993; Graça y Coimbra, 1998; Vega et al., 1998; Wunderlin, 2001). En este análisis, se utiliza toda la varianza o información contenida en el conjunto original de datos.

Existen dos tipos de análisis cluster, el análisis jerárquico y el no-jerárquico. El análisis jerárquico forma clusters de forma secuencial comenzando con el par de objeto más similares y formando clusters más altos paso a paso. La similitud entre dos muestras viene dada generalmente por distancias euclídeas, y una "distancia" puede estar representada por la "diferencia" entre valores analíticos de ambas muestras (Otto, 1998). Los métodos de análisis cluster no-jerárquico evalúan de forma global la distribución de pares de objetos y es entonces cuando los clasifica en un número prefijado de grupos. Tanto en el método jerárquico como en el no-jerárquico el proceso de formación y unión de clusters se repite hasta que queda finalmente un único cluster el cual contiene todas las muestras. Los resultados de este análisis se suele representar en *dendogramas*. Este tipo de representación proporciona un resumen visual del proceso de agrupamiento, de los grupos formados de su proximidad y de las distancias relativas entre grupos.

En un primer paso, cuando cada objeto representa su propio cluster, las distancias entre los objetos se definen por el tipo de distancia medida (p.e. distancias euclídeas). Una vez que se han formado los diferentes objetos es necesario una regla de unión o amalgamación para determinar cuando dos clusters son lo suficientemente similares como para que se unan. Para ello existen varias posibilidades entre las cuales se encuentra el *método de Ward*. Este método utiliza un análisis de la varianza para evaluar las distancias entre clusters, con objeto de minimizar la suma de cuadrados de cada dos clusters que se

forman en cada paso. Este método es el más utilizado en recientes trabajos de clasificación de muestras ambientales además de ser el método que utiliza más información y es el método más eficiente y significativo (Willet, 1987; Jonson y Wichern, 1992; Adams, 1998; Graça y Coimbra, 1998; Otto, 1998; Vega et al., 1998; Helena *et al.* 2000).

Para el análisis cluster de las zonas ambientales de estudio se ha seleccionado el cluster jerárquico aglomerativo por el método de Ward para la clasificación de las muestras. Para este análisis se han estandarizado las variables físico-químicas siguiendo las recomendaciones de los anteriores autores.

3.4.2.3. ANÁLISIS FACTORIAL Y ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES

El *análisis factorial* (FA: Factorial Analysis), que a su vez incluye el *análisis de componentes principales* (PCA) es una de las técnicas más potentes y comunes dentro del grupo de técnicas de simplificación o de reducción de la dimensión sin pérdida de información. Este análisis permite transformar un grupo inicial de variables correlacionadas en otro conjunto de variables ortogonales denominadas *componentes principales* (PC).

El PCA opera matemáticamente con la matriz de covarianza la cual describe la dispersión de un número múltiple de parámetros para obtener los denominados autovalores y autovectores. Un autovector es una lista de coeficientes los cuales son multiplicados por la matriz de correlación de las variables para obtener unas nuevas y no-correlacionadas variables, denominadas *componentes principales*. Así pues, los PCs se obtienen como combinaciones lineales de las variables originales y los autovectores de la siguiente forma:

$$Z_{ij} = a_{i1}x_{1j} + a_{i2}x_{2j} + a_{i3}x_{3j} + \dots + a_{im}x_{mj}$$

donde "a" es el componente calculado, "z" es el valor del componente, "x" el valor medido, "i" el número del componente, "j" el número de muestra, y "m" el número total de variables (Anazawa y Ohmori, 2001).

El número de autovalores que se pueden extraer es una decisión arbitraria, sin embargo, existen algunos criterios de decisión. El criterio más utilizado es el propuesto por Kaiser (StatSoft, 1997) que sólo extrae aquellos autovalores mayores que 1.

En la práctica, el FA sigue el PCA. El propósito fundamental del FA es reducir la contribución de las variables menos significativas con objeto de simplificar la estructura de datos proporcionada por el PCA. Para ello lo que se realiza es una rotación de los ejes definidos por los PCA. De esta forma se generan nuevos grupos de variables denominados varifactores (VFs) los cuales se expresan matemáticamente de la siguiente forma:

$$Z_{ij} = a_{i1}f_{1j} + a_{i2}f_{2j} + a_{i3}f_{3j} + \dots + a_{im}f_{mj} + e_{fi}$$

donde "z" es el valor medido, "f" es el valor del factor, "a" el factor calculado, "e" es el término residual y refleja los errores u otras fuentes de variación, "i" es el número de muestra, "j" el valor de la variable, y "m" el número total de factores (Anazawa y Ohmori, 2001).

Como se puede apreciar, los dos métodos se expresan con ecuaciones muy similares. La diferencia está en que en el caso del PCA, los componentes principales se expresan como combinaciones lineales de las variables medidas, mientras que en el caso del FA las variables medidas se expresan como combinación de factores más una serie de términos residuales. Aplicando estas técnicas a muestras ambientales, estas diferencias podrían explicarse de forma que los PC serían combinaciones lineales de la calidad del agua observada, mientras que los VF pueden mostrar variables "latentes" no observables o hipotéticas (Chapman, 1992; Otto, 1998; Vega *et al.*, 1998; Helena *et al.*, 2000; Wunderlin *et al.*, 2001).

Para la obtención de los varifactores existen diversas técnicas de rotación. Una de las más utilizadas en diversos trabajos para evaluar cambios espaciales y temporales es la rotación *varimax* (Vega *et al.*, 1998; Helena *et al.*, 2000; Wunderlin *et al.*, 2001). Gráficamente podemos representar los factores obtenidos en un diagrama de dispersión de forma que las variables se representa como un punto. En este gráfico se pueden rotar los ejes en cualquier dirección sin cambiar la posición relativa entre los puntos o variables, pero sí cambian los factores obtenidos. En la rotación *varimax* se hacen rotar los ejes maximizando la varianza sobre uno de los ejes y consiguiendo al mismo tiempo minimizar la varianza alrededor de la nueva variable.

El uso de FA/PCA para el seguimiento de la calidad del agua se ha incrementado en los últimos años, principalmente debido a la necesidad de obtener una reducción apreciable de los datos con objeto de realizar un mejor análisis de los resultados (Chapman, 1992; Kucuksezgin, 1996; Chiacchio *et al.*, 1997; Vega *et al.*, 1998; Morales *et al.*, 1999; Helena *et al.*, 2000; Wunderlin *et al.*, 2001; Anazawa *et al.*, 2001; Kuang-Chung, 2001).

3.4.3. ESTANDARIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Para algunas de las técnicas de análisis propuestas en este estudio, se han estandarizado las variables siguiendo las recomendaciones de algunos autores.

Cualquier valor "x" de un conjunto de observaciones puede estandarizarse respecto a la media de la población en "unidades de desviación estándar". El valor estandarizado se denomina *z-score* y se obtiene de la siguiente forma:

$$z = \frac{(x - m)}{s}$$

siendo "x" el valor que se quiere estandarizar, "μ" la media de la población y "σ" la desviación estándar.

3.4.4. RESUMEN DE TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE DATOS

A modo de resumen, se ha construido la siguiente tabla en la cual queda reflejada las técnicas de análisis de datos utilizadas y los objetivos que se pretenden conseguir con éstas.

Tabla C II.15.
Resumen de objetivos del análisis de datos físico-químicos

| | |
|--------------------------------------|---|
| Histogramas de frecuencias | <ul style="list-style-type: none"> ■ <u>Objetivo principal</u> Obtener un visión de la distribución de valores de cada variable en cada área ambiental ■ <u>Aplicación</u> <ul style="list-style-type: none"> – Obtener los porcentajes de observaciones a determinadas concentraciones. – Estudio de la adecuación de lo objetivos de calidad definidos para cada variable en caso de existir. En caso de que todavía no se hayan previsto objetivos de calidad para un determinado parámetro, proponer un objetivo de calidad fundamentado en los niveles basales (<i>Capítulo IV</i>) |
| Diagramas de datos ordenados | <ul style="list-style-type: none"> □ <u>Objetivo principal</u> Obtener un visión de la distribución de valores de cada variable en cada área ambiental □ <u>Aplicación</u> Corroborar las conclusiones obtenidas con los histogramas de frecuencia |
| Diagramas de Box-Whiskers | <ul style="list-style-type: none"> ■ <u>Objetivo principal</u> Obtener un visión espacial de cada variable en las áreas ambientales ■ <u>Aplicación</u> Corroborar las conclusiones obtenidas con otros análisis |
| Matrices de correlación | <ul style="list-style-type: none"> □ <u>Objetivo principal</u> Determinar relaciones lineales entre las variables □ <u>Aplicación</u> Identificar procesos/comportamientos de las variables y los sistemas |
| Análisis cluster –variables- | <ul style="list-style-type: none"> ■ <u>Objetivo principal</u> Determinar agrupamientos de variables ■ <u>Aplicación</u> Identificar procesos/comportamientos de las variables y los sistemas |
| Análisis cluster –estaciones- | <ul style="list-style-type: none"> ■ <u>Objetivo principal</u> <ul style="list-style-type: none"> – Determinar agrupamientos de zonas (estaciones, transectos) – Clasificar las estaciones de muestreo en función de su calidad ambiental ■ <u>Aplicación</u> <ul style="list-style-type: none"> – Zonificación – Realizar una evaluación acerca de la variabilidad espacial de la calidad del agua en la Ría de Huelva y determinar “zonas críticas” |
| PCA/FA | <ul style="list-style-type: none"> □ <u>Objetivo principal</u> Determinar relaciones no-lineales entre variables. Reducción del número de variables en factores. □ <u>Aplicación</u> <ul style="list-style-type: none"> – Corresponder los diferentes factores y varifactores con procesos naturales – Identificar procesos/comportamientos de las variables y los sistemas |

3.5. DEFINICIÓN DE LOS ÍNDICES DE CALIDAD AMBIENTAL

Con objeto de definir de la mejor forma posible la calidad ambiental de las zonas de estudio para cada estación de muestreo se han aplicado dos índices de calidad ambiental basados en la metodología propuesta por Chapman (Chapman, 1990) y Del Valls (Del Valls, 1994, 1998) y aplicados posteriormente por diversos autores (Hall y Alden, 1997; Garrido *et al.*, 2000, Acevedo, 2001; Perales, 2001; Tovar, 2001).

- I_{Ref} o *índice respecto a la estación de referencia*, basado en el grado de alteración de cada estación de muestreo respecto a una estación prefijada de referencia.
- I_c o *índice de contaminación*, basado en el grado de alteración relativo de una estación de muestreo respecto al conjunto de estaciones consideradas para el cálculo del índice.

3.5.1. INDICE RESPECTO A LA ESTACIÓN DE REFERENCIA

El I_{Ref} se calcula como el promedio de un número de subíndices denominados RT_{Ref} (Ratio to Reference: Razón respecto a los valores de referencia). Los RT_{Ref} se calculan para un número prefijado de parámetros y se obtienen dividiendo el valor obtenido del parámetro en cada estación de muestreo por los valores de referencia (Chapman, 1990).

$$RT_{Ref_{ij}} = \frac{V_{ij}}{V_{iRef}} \quad ; \quad I_{Ref_j} = \frac{\sum_{i=1}^n RT_{Ref_{ij}}}{n}$$

donde:

i: parámetro

j: estación de muestreo

n: número de parámetros seleccionados para el diseño del índice

V_{ij} : valor del parámetro "i" en la estación "j"

V_{iRef} : valor de referencia del parámetro "i"

$RT_{Ref_{ij}}$: subíndice RT_{Ref} del parámetro "i" en la estación "j"

I_{Ref_j} : Índice respecto a valores de referencia calculado en la estación "j"

Tal y como se ha definido el índice puede decirse que I_{Ref} es mayor que 1. Sólo en aquellos casos en los que la calidad de las aguas de las estaciones de muestreo sea mejor que la estación de referencia, se obtendrán valores inferiores a 1. De esta forma, si se seleccionan parámetros característicos en vertidos de aguas residuales o son indicativas de procesos tales como eutrofización, contaminación por compuestos específicos, etc., entonces cuanto menor sea el índice, mayor será la calidad de las aguas, y cuanto mayor sea el índice peor será la calidad de las aguas.

Los diferentes autores que diseñan y utilizan estos índices, definen para cada estudio concreto una estación de referencia. En el presente estudio se están caracterizando cuatro áreas litorales, por tanto, para el desarrollo de estos índices es necesario fijar cuatro estaciones de referencia, una en cada área ambiental. Al objeto de poder comparar las diferentes áreas ambientales, en este estudio se propone utilizar unos *valores de referencia* en sustitución de la estación de referencia. Como se podrá comprobar en el desarrollo de este documento, seleccionar a priori una estación de referencia indicativa de "aguas limpias" no es tarea fácil y en gran número de ocasiones, pueden no resultar adecuadas.

Realizando esta variación, es posible realizar estudios comparativos espaciales o temporales. En el apartado 3.5.3. se definen estos valores de referencia.

3.5.2. INDICE RESPECTO A LOS VALORES MÁXIMOS O ÍNDICE DE CONTAMINACIÓN

El I_c se calcula como el promedio de un número de subíndices denominados **RTM** (Ratio to Maximum: Razón respecto al valor máximo) (Del Valls, 1994). Los RTM se calculan para un número prefijado de parámetros y se obtienen dividiendo el valor del parámetro obtenido en cada estación de muestreo por el valor de la estación que haya dado el resultado más elevado.

$$RTM_{ij} = \frac{V_{ij}}{V_{im}} ; \quad I_{c_j} = \frac{\sum_{i=1}^n RTM_{ij}}{n}$$

donde:

i: parámetro

j: estación de muestreo

n: número de parámetros seleccionados para el diseño del índice

V_{ij} : valor del parámetro "i" en la estación "j"

V_{im} : máximo valor del parámetro i del conjunto de estaciones de muestreo

RTM_{ij} = razón con respecto al valor máximo del parámetro i en el punto de muestreo j

I_{c_j} : Índice de la estación "j"

Tal y como se ha definido, el índice oscila entre 0 y 1.

Si se seleccionan parámetros que presentan altas concentraciones en vertidos de aguas residuales o son indicativas de procesos tales como eutrofización, contaminación por compuestos específicos, etc., entonces cuanto menor sea el índice, mayor será la calidad de las aguas, y cuanto mayor sea el índice peor será la calidad de las aguas.

Hay que tener en cuenta que esta escala de "calidad" es relativa y específica de cada estudio puesto que para la obtención del índice se requiere el valor máximo medido para cada parámetro. Por tanto, este índice una vez definido y calculado, no permite comparaciones espaciales ni temporales.

3.5.3. CONSIDERACIONES PREVIAS AL CÁLCULO DE LOS ÍNDICES

Para el cálculo de los índices se han realizado una serie de consideraciones previas las cuales se exponen a continuación:

Respecto a los parámetros que forman el índice:

- Sólo se han considerado aquellos parámetros incluidos en los programas de muestreo de las cuatro áreas litorales.
- Se le ha dado el mismo peso a todos los parámetros.
- Se ha prestado una atención especial a aquellos parámetros que han presentado un papel importante en los análisis estadísticos y en las representaciones gráficas (correlaciones de Pearson, cluster, PCA/FA; diagramas de box-whisker).
- Se ha incluido el parámetro clorofila *a* por su significado ambiental.

Respecto a los valores considerados para el cálculo del índice:

- Se ha operado con los valores promedios de cada estación de muestreo y con los valores promedios de cada transecto.
- Variables no medidas (o valores perdidos) en alguna estación particular, han sido sustituidos por el promedio de las dos estaciones más próximas (Tabachnick y Fidell, 1996).
- Aquellos valores por debajo del límite de detección del método analítico, han sido sustituidos por la mitad del límite de detección (Gilliom y Helsel, 1986).
- Como valores de referencia se ha considerado la media aritmética de una serie anual de mediciones realizadas en la estación SP (Sancti Petri). Los resultados de estas medias se han redondeado ligeramente hacia el número múltiplo de cinco más próximo por motivos prácticos. Estos valores son los que se resumen en la siguiente tabla.

En esta misma tabla, se muestran los parámetros seleccionados para el diseño de los índices de calidad ambiental.

Tabla C II.16. Valores de referencia para el cálculo de los I_{Ref}

| Parámetros del I_c e I_{Ref} | Promedio de Sancti Petri (serie anual 2000-2001) | Valores de Referencia (mg/L) |
|---|---|---|
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 0,003 | 0,005 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 0,010 | 0,010 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 0,048 | 0,050 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 0,011 | 0,010 |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,073 | 0,075 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,049 | 0,050 |
| Clorofila <i>a</i> (mg/m ³) | 0,997 | 1,000 |
| Carbono Total (mg/L C) | 27,97 | 28,00 |
| Sólidos Suspensión (mg/L) | 74,3 | 75,0 |

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA RÍA DE HUELVA

4.1.1. RESULTADOS PROMEDIOS OBTENIDOS EN LAS ESTACIONES DE MUESTREO

Como ya se comentó en el apartado anterior, en la Ría de Huelva se dispusieron cuatro transectos transversales a la ría y un transecto longitudinal. Los resultados que se muestran a continuación son los resultados promedios de cuatro muestreos realizados en estaciones climatológicas extremas (invierno y verano) durante el periodo 1999-2000. La última columna representa los valores medios de cada transecto obtenidos como los promedios de las estaciones de muestreo que conforman el transecto en cuestión.

Tabla C II.17. Promedio de las variables físico-químicas. Transecto H1

| Parámetros \ Estaciones | H1A | H1B | H1C | H1 |
|---|--------------|--------------|---------------|--------------|
| pH | 7,85 | 7,85 | 7,86 | 7,85 |
| Desv.Est. | 0,21 | 0,28 | 0,20 | 0,21 |
| Temperatura (°C) | 18,0 | 18,0 | 17,9 | 17,9 |
| Desv.Est. | 5,5 | 5,6 | 5,7 | 5,0 |
| Salinidad | 36,1 | 36,4 | 36,6 | 36,4 |
| Desv.Est. | 1,5 | 1,1 | 1,4 | 1,2 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,048 | 0,054 | 0,052 | 0,051 |
| Desv.Est. | 0,027 | 0,030 | 0,038 | 0,029 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,029 | 0,028 | 0,030 | 0,029 |
| Desv.Est. | 0,020 | 0,019 | 0,021 | 0,018 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,076 | 0,085 | 0,109 | 0,090 |
| Desv.Est. | 0,053 | 0,066 | 0,080 | 0,062 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | 0,123 | 0,116 | 0,120 | 0,120 |
| Desv.Est. | 0,038 | 0,028 | 0,024 | 0,028 |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,334 | 0,380 | 0,393 | 0,369 |
| Desv.Est. | 0,248 | 0,268 | 0,253 | 0,233 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,163 | 0,120 | 0,234 | 0,172 |
| Desv.Est. | 0,136 | 0,084 | 0,282 | 0,169 |
| Carbono total (mg/L C) | 31,84 | 29,33 | 28,42 | 29,86 |
| Desv.Est. | 4,75 | 2,48 | 1,84 | 3,32 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 23,77 | 22,09 | 21,98 | 22,61 |
| Desv.Est. | 1,84 | 2,60 | 2,52 | 2,29 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 8,07 | 7,24 | 6,44 | 7,25 |
| Desv.Est. | 4,04 | 4,46 | 2,93 | 3,56 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 64,40 | 58,57 | 101,83 | 74,94 |
| Desv.Est. | 89,77 | 85,09 | 156,78 | 106,19 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 19,36 | 17,04 | 21,36 | 19,25 |
| Desv.Est. | 20,56 | 20,65 | 34,38 | 23,61 |
| Cobre (mg/L Cu) | 0,049 | 0,044 | 0,048 | 0,047 |
| Desv.Est. | 0,012 | 0,009 | 0,013 | 0,011 |
| Plomo (mg/L Pb) | 0,009 | 0,008 | 0,008 | 0,008 |
| Desv.Est. | 0,003 | 0,002 | 0,001 | 0,002 |
| Cadmio (mg/L Cd) | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,002 |
| Desv.Est. | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Zinc (mg/L Zn) | 0,178 | 0,166 | 0,212 | 0,185 |
| Desv.Est. | 0,137 | 0,127 | 0,212 | 0,149 |

Tabla C II.18. Promedio de las variables físico-químicas. Transecto H2

| Parámetros \ Estaciones | H2A | H2B | H2C | H2 |
|---|-------------------|--------------|-------------------|-------------------|
| pH | 8,03 | 7,96 | 7,91 | 7,97 |
| Desv.Est. | 0,21 | 0,24 | 0,15 | 0,19 |
| Temperatura (°C) | 17,5 | 17,3 | 17,1 | 17,3 |
| Desv.Est. | 5,0 | 4,9 | 5,3 | 4,6 |
| Salinidad | 36,4 | 36,1 | 35,6 | 36,0 |
| Desv.Est. | 1,1 | 1,3 | 2,5 | 1,6 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,074 | 0,040 | 0,040 | 0,051 |
| Desv.Est. | 0,050 | 0,024 | 0,028 | 0,036 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,020 | 0,022 | 0,024 | 0,022 |
| Desv.Est. | 0,015 | 0,017 | 0,020 | 0,016 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,068 | 0,083 | 0,071 | 0,074 |
| Desv.Est. | 0,046 | 0,061 | 0,053 | 0,049 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | 0,105 | 0,094 | 0,091 | 0,097 |
| Desv.Est. | 0,053 | 0,026 | 0,026 | 0,035 |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,443 | 0,216 | 0,238 | 0,299 |
| Desv.Est. | 0,406 | 0,120 | 0,114 | 0,253 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,049 | 0,046 | 0,078 | 0,058 |
| Desv.Est. | 0,025 | 0,027 | 0,044 | 0,033 |
| Carbono total (mg/L C) | 30,09 | 31,41 | 34,77 | 32,09 |
| Desv.Est. | 3,02 | 5,65 | 11,22 | 7,06 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 23,21 | 25,42 | 25,32 | 24,65 |
| Desv.Est. | 1,60 | 2,78 | 2,49 | 2,37 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 6,87 | 5,99 | 9,45 | 7,44 |
| Desv.Est. | 4,54 | 2,91 | 8,84 | 5,62 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 58,91 | 67,33 | 58,50 | 61,06 |
| Desv.Est. | 48,22 | 87,27 | 84,56 | 66,20 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 23,93 | 19,33 | 15,48 | 19,60 |
| Desv.Est. | 24,89 | 20,55 | 15,17 | 18,81 |
| Cobre (mg/L Cu) | 0,051 | 0,038 | 0,034 | 0,041 |
| Desv.Est. | 0,031 | 0,010 | 0,008 | 0,019 |
| Plomo (mg/L Pb) | 0,012 | 0,008 | 0,009 | 0,009 |
| Desv.Est. | 0,009 | 0,002 | 0,005 | 0,006 |
| Cadmio (mg/L Cd) | < 0,001 | 0,002 | < 0,001 | < 0,001 |
| Desv.Est. | --- | 0,001 | --- | --- |
| Zinc (mg/L Zn) | 0,117 | 0,124 | 0,111 | 0,117 |
| Desv.Est. | 0,075 | 0,119 | 0,093 | 0,088 |

Tabla C II.19. Promedio de las variables físico-químicas. Transecto H3

| Parámetros \ Estaciones | H3A | H3B | H3C | H3 |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| pH | 8,08 | 8,07 | 8,07 | 8,07 |
| Desv.Est. | 0,16 | 0,13 | 0,15 | 0,13 |
| Temperatura (°C) | 16,8 | 17,0 | 16,9 | 16,9 |
| Desv.Est. | 3,7 | 3,9 | 4,0 | 3,5 |
| Salinidad | 36,9 | 36,9 | 37,1 | 37,0 |
| Desv.Est. | 1,8 | 1,8 | 1,7 | 1,6 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,021 | 0,013 | 0,019 | 0,018 |
| Desv.Est. | 0,014 | 0,015 | 0,013 | 0,013 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,007 | 0,009 | 0,011 | 0,009 |
| Desv.Est. | 0,007 | 0,008 | 0,011 | 0,008 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,042 | 0,065 | 0,040 | 0,049 |
| Desv.Est. | 0,021 | 0,044 | 0,028 | 0,032 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | 0,038 | 0,043 | 0,047 | 0,043 |
| Desv.Est. | 0,009 | 0,012 | 0,014 | 0,011 |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,161 | 0,199 | 0,239 | 0,200 |
| Desv.Est. | 0,057 | 0,108 | 0,139 | 0,102 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,045 | 0,051 | 0,037 | 0,044 |
| Desv.Est. | 0,054 | 0,060 | 0,044 | 0,046 |
| Carbono total (mg/L C) | 31,85 | 29,91 | 30,54 | 30,77 |
| Desv.Est. | 5,50 | 1,82 | 2,81 | 3,47 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 24,24 | 23,44 | 23,73 | 23,81 |
| Desv.Est. | 1,34 | 1,99 | 1,63 | 1,55 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 7,61 | 6,47 | 6,81 | 6,96 |
| Desv.Est. | 6,75 | 3,77 | 4,31 | 4,65 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 59,40 | 52,75 | 62,54 | 58,23 |
| Desv.Est. | 63,20 | 76,88 | 63,20 | 61,72 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 21,85 | 18,25 | 17,70 | 19,27 |
| Desv.Est. | 13,42 | 14,41 | 14,83 | 13,02 |
| Cobre (mg/L Cu) | 0,025 | 0,020 | 0,027 | 0,024 |
| Desv.Est. | 0,011 | 0,006 | 0,002 | 0,007 |
| Plomo (mg/L Pb) | 0,006 | 0,004 | 0,006 | 0,006 |
| Desv.Est. | 0,003 | 0,001 | 0,001 | 0,002 |
| Cadmio (mg/ L Cd) | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| Desv.Est. | --- | --- | --- | --- |
| Zinc (mg/L Zn) | 0,059 | 0,047 | 0,065 | 0,057 |
| Desv.Est. | 0,048 | 0,037 | 0,041 | 0,039 |

Tabla C II.20. Promedio de las variables físico-químicas. Transecto H4

| Parámetros \ Estaciones | H4A | H4B | H4C | H4 |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| pH | 8,16 | 8,17 | 8,14 | 8,16 |
| Desv.Est. | 0,16 | 0,21 | 0,13 | 0,15 |
| Temperatura (°C) | 17,8 | 17,6 | 17,7 | 17,7 |
| Desv.Est. | 5,0 | 5,0 | 4,4 | 4,3 |
| Salinidad | 37,1 | 37,1 | 37,4 | 37,2 |
| Desv.Est. | 1,4 | 1,7 | 2,1 | 1,6 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,013 | 0,014 | 0,015 | 0,014 |
| Desv.Est. | 0,010 | 0,015 | 0,010 | 0,011 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,005 | 0,003 | 0,005 | 0,004 |
| Desv.Est. | 0,004 | 0,002 | 0,006 | 0,004 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,069 | 0,103 | 0,089 | 0,087 |
| Desv.Est. | 0,069 | 0,116 | 0,092 | 0,087 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | 0,022 | 0,022 | 0,026 | 0,023 |
| Desv.Est. | 0,007 | 0,007 | 0,005 | 0,006 |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,264 | 0,256 | 0,292 | 0,271 |
| Desv.Est. | 0,206 | 0,215 | 0,204 | 0,189 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,100 | 0,055 | 0,060 | 0,072 |
| Desv.Est. | 0,159 | 0,078 | 0,087 | 0,101 |
| Carbono total (mg/L C) | 33,32 | 31,14 | 31,20 | 31,89 |
| Desv.Est. | 5,16 | 2,53 | 2,71 | 3,48 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 25,18 | 24,40 | 24,59 | 24,72 |
| Desv.Est. | 1,37 | 2,27 | 1,81 | 1,71 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 8,15 | 6,75 | 6,62 | 7,17 |
| Desv.Est. | 6,42 | 4,78 | 4,40 | 4,82 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 65,44 | 70,63 | 55,96 | 64,01 |
| Desv.Est. | 80,27 | 100,37 | 78,80 | 78,98 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 21,35 | 25,57 | 16,83 | 21,25 |
| Desv.Est. | 17,72 | 28,66 | 16,80 | 20,01 |
| Cobre (mg/L Cu) | 0,013 | 0,014 | 0,018 | 0,015 |
| Desv.Est. | 0,005 | 0,004 | 0,006 | 0,005 |
| Plomo (mg/L Pb) | 0,003 | 0,004 | 0,004 | 0,004 |
| Desv.Est. | 0,001 | 0,002 | 0,002 | 0,002 |
| Cadmio (mg/ L Cd) | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | < 0,001 |
| Desv.Est. | --- | --- | --- | --- |
| Zinc (mg/L Zn) | 0,025 | 0,023 | 0,028 | 0,025 |
| Desv.Est. | 0,010 | 0,011 | 0,013 | 0,011 |

Tabla C II.21. Promedio de las variables físico-químicas. Transecto H5

| Parámetros \ Estaciones | H5A | H5B | H5C | H5D | H5E | H5F | H5 |
|---|--------------|--------------|-------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|
| pH | 7,86 | 7,96 | 8,00 | 8,09 | 7,80 | 7,83 | 7,92 |
| Desv.Est. | 0,20 | 0,03 | 0,13 | 0,10 | 0,24 | 0,21 | 0,18 |
| Temperatura (°C) | 19,0 | 18,1 | 18,6 | 19,1 | 18,8 | 19,0 | 18,8 |
| Desv.Est. | 5,8 | 5,1 | 4,8 | 5,0 | 6,3 | 6,6 | 4,7 |
| Salinidad | 36,0 | 36,7 | 37,2 | 37,0 | 36,5 | 36,7 | 36,7 |
| Desv.Est. | 1,0 | 1,2 | 1,8 | 2,0 | 0,5 | 0,6 | 1,2 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,052 | 0,019 | 0,027 | 0,013 | 0,119 | 0,063 | 0,049 |
| Desv.Est. | 0,038 | 0,011 | 0,024 | 0,013 | 0,099 | 0,076 | 0,059 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,016 | 0,012 | 0,005 | 0,004 | 0,033 | 0,025 | 0,016 |
| Desv.Est. | 0,014 | 0,012 | 0,006 | 0,005 | 0,032 | 0,031 | 0,020 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,108 | 0,081 | 0,085 | 0,093 | 0,126 | 0,129 | 0,104 |
| Desv.Est. | 0,046 | 0,022 | 0,048 | 0,081 | 0,030 | 0,025 | 0,044 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | 0,064 | 0,057 | 0,027 | 0,015 | 0,123 | 0,152 | 0,073 |
| Desv.Est. | 0,022 | 0,026 | 0,000 | 0,001 | 0,032 | 0,056 | 0,057 |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,159 | 0,185 | 0,118 | 0,129 | 0,403 | 0,458 | 0,242 |
| Desv.Est. | 0,045 | 0,088 | 0,015 | 0,129 | 0,283 | 0,185 | 0,190 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,110 | 0,050 | 0,046 | 0,056 | 0,367 | 0,337 | 0,161 |
| Desv.Est. | 0,147 | 0,025 | 0,061 | 0,084 | 0,362 | 0,351 | 0,232 |
| Carbono total (mg/L C) | 30,55 | 39,43 | 33,26 | 31,95 | 26,02 | 28,54 | 31,63 |
| Desv.Est. | 2,91 | 17,31 | 4,31 | 3,53 | 4,52 | 2,96 | 7,87 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 23,58 | 27,13 | 25,24 | 24,35 | 21,35 | 21,67 | 23,89 |
| Desv.Est. | 1,76 | 3,86 | 0,73 | 2,40 | 2,59 | 3,74 | 3,09 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 6,98 | 12,30 | 8,02 | 7,60 | 4,68 | 6,87 | 7,74 |
| Desv.Est. | 4,06 | 13,46 | 5,03 | 5,87 | 1,93 | 1,47 | 6,05 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 82,53 | 68,93 | 83,67 | 71,64 | 65,76 | 72,47 | 74,17 |
| Desv.Est. | 98,42 | 94,52 | 81,09 | 97,60 | 98,09 | 99,30 | 80,15 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 21,84 | 17,47 | 32,00 | 17,00 | 17,95 | 18,27 | 20,75 |
| Desv.Est. | 25,15 | 19,52 | 21,00 | 17,44 | 19,09 | 19,69 | 18,02 |
| Cobre (mg/L Cu) | 0,041 | 0,037 | 0,024 | 0,009 | 0,070 | 0,050 | 0,038 |
| Desv.Est. | 0,020 | 0,029 | 0,012 | 0,002 | 0,021 | 0,012 | 0,025 |
| Plomo (mg/L Pb) | 0,007 | 0,007 | 0,005 | 0,002 | 0,010 | 0,008 | 0,006 |
| Desv.Est. | 0,004 | 0,005 | 0,002 | 0,000 | 0,006 | 0,004 | 0,004 |
| Cadmio (mg/L Cd) | 0,001 | 0,001 | < 0,001 | < 0,001 | 0,003 | 0,003 | 0,002 |
| Desv.Est. | 0,001 | 0,001 | --- | --- | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Zinc (mg/L Zn) | 0,125 | 0,105 | 0,051 | 0,019 | 0,331 | 0,238 | 0,145 |
| Desv.Est. | 0,104 | 0,128 | 0,031 | 0,008 | 0,287 | 0,246 | 0,180 |

Tabla C II.22. Promedio de las variables físico-químicas. RIA DE HUELVA

| Datos | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | Ría de Huelva |
|--|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| PARAMETROS MICROBIOLÓGICOS | | | | | | |
| C. fecales (UFC/100 mL) | 1,47E+03 | 1,29E+03 | 8,00E+01 | 3,87E+02 | --- | 8,05E+02 |
| Desv. Est. | 9,24E+01 | 1,22E+02 | 6,00E+01 | 1,01E+02 | --- | 6,17E+02 |
| E. fecales (UFC/100 mL) | 3,00E+01 | 3,00E+01 | 1,33E+02 | 6,00E+01 | --- | 6,33E+01 |
| Desv. Est. | 2,65E+01 | 1,73E+01 | 4,16E+01 | 4,00E+01 | --- | 5,23E+01 |
| PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS | | | | | | |
| pH | 7,85 | 7,97 | 8,07 | 8,16 | 7,92 | 7,99 |
| Desv.Est. | 0,21 | 0,19 | 0,13 | 0,15 | 0,18 | 0,20 |
| Temperatura (°C) | 17,9 | 17,3 | 16,9 | 17,7 | 18,8 | 17,8 |
| Desv.Est. | 5,0 | 4,6 | 3,5 | 4,3 | 4,7 | 4,4 |
| Salinidad | 36,4 | 36,0 | 37,0 | 37,2 | 36,7 | 36,7 |
| Desv.Est. | 1,2 | 1,6 | 1,6 | 1,6 | 1,2 | 1,4 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,051 | 0,051 | 0,018 | 0,014 | 0,049 | 0,038 |
| Desv.Est. | 0,029 | 0,036 | 0,013 | 0,011 | 0,059 | 0,040 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,029 | 0,022 | 0,009 | 0,004 | 0,016 | 0,016 |
| Desv.Est. | 0,018 | 0,016 | 0,008 | 0,004 | 0,020 | 0,017 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,090 | 0,074 | 0,049 | 0,087 | 0,104 | 0,083 |
| Desv.Est. | 0,062 | 0,049 | 0,032 | 0,087 | 0,044 | 0,058 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | 0,120 | 0,097 | 0,043 | 0,023 | 0,073 | 0,071 |
| Desv.Est. | 0,028 | 0,035 | 0,011 | 0,006 | 0,057 | 0,048 |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,369 | 0,299 | 0,200 | 0,271 | 0,242 | 0,273 |
| Desv.Est. | 0,233 | 0,253 | 0,102 | 0,189 | 0,190 | 0,201 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,172 | 0,058 | 0,044 | 0,072 | 0,161 | 0,111 |
| Desv.Est. | 0,169 | 0,033 | 0,046 | 0,101 | 0,232 | 0,163 |
| Carbono total (mg/L C) | 29,86 | 32,09 | 30,77 | 31,89 | 31,63 | 31,28 |
| Desv.Est. | 3,32 | 7,06 | 3,47 | 3,48 | 7,87 | 5,59 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 22,61 | 24,65 | 23,81 | 24,72 | 23,89 | 23,93 |
| Desv.Est. | 2,29 | 2,37 | 1,55 | 1,71 | 3,09 | 2,40 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 7,25 | 7,44 | 6,96 | 7,17 | 7,74 | 7,35 |
| Desv.Est. | 3,56 | 5,62 | 4,65 | 4,82 | 6,05 | 4,97 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 74,94 | 61,06 | 58,23 | 64,01 | 74,17 | 67,27 |
| Desv.Est. | 106,19 | 66,20 | 61,72 | 78,98 | 80,15 | 78,13 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 19,25 | 19,60 | 19,27 | 21,25 | 20,75 | 20,10 |
| Desv.Est. | 23,61 | 18,81 | 13,02 | 20,01 | 18,02 | 18,33 |
| Clorofila a (mg/m³) | 11,200 | 6,925 | 4,200 | 2,825 | 12,900 (*) | 7,610 |
| Desv.Est. | 4,347 | 2,986 | 0,812 | 1,801 | 7,303 | 4,355 |
| Dureza cálcica (mg/L CaCO₃) | 652 | 655 | 663 | 658 | n.d. | 657 |
| Desv.Est. | --- | --- | --- | --- | --- | 5 |
| Tensioactivos aniónicos (mg/L LAS) | 0,034 | 0,032 | 0,055 | 0,030 | 0,050 (*) | 0,040 |
| Desv.Est. | 0,008 | 0,027 | --- | 0,033 | 0,016 | 0,012 |
| Fenoles (mg/L C₆H₅OH) | < 0,037 |
| Desv.Est. | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Aceites y Grasas (mg/L) | 8,3 | 48,9 | 30,1 | < 2,0 | 17,2 (*) | 26,1 |
| Desv.Est. | --- | --- | --- | --- | 6,7 | 17,6 |
| Cobre (mg/L Cu) | 0,047 | 0,041 | 0,024 | 0,015 | 0,038 | 0,034 |
| Desv.Est. | 0,011 | 0,019 | 0,007 | 0,005 | 0,025 | 0,020 |
| Ploomo (mg/L Pb) | 0,008 | 0,009 | 0,006 | 0,004 | 0,006 | 0,007 |
| Desv.Est. | 0,002 | 0,006 | 0,002 | 0,002 | 0,004 | 0,004 |
| Cadmio (mg/L Cd) | 0,002 | 0,001 | 0,001 | < 0,001 | 0,002 | 0,001 |
| Desv.Est. | 0,001 | 0,000 | 0,000 | --- | 0,001 | 0,001 |
| Zinc (mg/L Zn) | 0,185 | 0,117 | 0,057 | 0,025 | 0,145 | 0,109 |
| Desv.Est. | 0,149 | 0,088 | 0,039 | 0,011 | 0,180 | 0,131 |

n.d.: no determinado; (*) promedio de las estaciones H5E y H5F exclusivamente

4.1.2 ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS TRANSECTOS DE LA RÍA DE HUELVA

La estadística descriptiva de los transectos se ha realizado mediante el paquete estadístico Statistica 6,0 (StatSoft, 1997).

Con objeto de obtener resultados representativos, los parámetros seleccionados para este análisis estadístico son aquellos que se han determinado con más frecuencia y en todas las estaciones de muestreo. Estos son:

- pH
- Temperatura
- Salinidad
- Amonio
- Nitritos
- Nitratos
- Fosfatos
- Fósforo total
- Silicatos
- Carbono disuelto
- Carbono inorgánico disuelto
- Carbono orgánico disuelto
- Sólidos en suspensión
- Sólidos volátiles
- Cobre
- Plomo
- Cadmio
- Zinc

Algunos parámetros sólo se han medido en las muestras compuestas representativas de cada transecto. Debido al escaso número de datos, estos análisis no se han incluido en el análisis estadístico. Estos parámetros son:

- Coliformes fecales
- Estreptococos fecales
- Tensioactivos aniónicos
- Índice de fenoles
- Grasas y aceites
- Clorofila
- Dureza cálcica

En las tablas resumen de este estudio se ha incluido el número de observaciones válidas utilizadas para cada parámetro, la media, el intervalo de confianza de la media, desviación estándar, mediana, valores máximos y mínimos y los cuartiles inferiores y superiores.

Tabla C II.23. Estudio estadístico del transecto H1 de la Ría de Huelva

| H1 | N Válidos | IntConf. -95% | Media | IntConf. +95% | Desv. Est. | Mediana | Mínimo | Máximo | Cuartil Inferior | Cuartil Superior | Varianza |
|------------------------------------|--------------|------------------|-------|------------------|---------------|---------|--------|--------|---------------------|---------------------|----------|
| pH | 12 | 7,72 | 7,85 | 7,98 | 0,21 | 7,77 | 7,59 | 8,22 | 7,72 | 8,02 | 4,37E-02 |
| T (°C) | 12 | 14,7 | 17,9 | 21,1 | 5,0 | 18,4 | 11,7 | 23,2 | 13,2 | 22,7 | 2,54E+01 |
| S | 12 | 35,6 | 36,4 | 37,2 | 1,2 | 36,5 | 34,0 | 38,0 | 35,5 | 37,5 | 1,55E+00 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 12 | 0,033 | 0,051 | 0,070 | 0,029 | 0,052 | 0,012 | 0,103 | 0,029 | 0,068 | 8,33E-04 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 12 | 0,018 | 0,029 | 0,041 | 0,018 | 0,028 | 0,011 | 0,051 | 0,012 | 0,046 | 3,28E-04 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 12 | 0,051 | 0,090 | 0,130 | 0,062 | 0,091 | 0,000 | 0,209 | 0,051 | 0,123 | 3,88E-03 |
| ΣN (mg/L N) | 12 | 0,127 | 0,171 | 0,215 | 0,070 | 0,148 | 0,102 | 0,280 | 0,109 | 0,228 | 4,84E-03 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 12 | 0,102 | 0,120 | 0,137 | 0,028 | 0,117 | 0,085 | 0,176 | 0,095 | 0,140 | 7,67E-04 |
| P total (mg/L P) | 12 | 0,221 | 0,369 | 0,517 | 0,233 | 0,311 | 0,117 | 0,724 | 0,167 | 0,567 | 5,45E-02 |
| Si (mg/L Si-SiO ₄) | 9 | 0,042 | 0,172 | 0,302 | 0,170 | 0,077 | 0,065 | 0,559 | 0,069 | 0,216 | 2,87E-02 |
| CT (mg/L C) | 12 | 27,75 | 29,86 | 31,97 | 3,32 | 28,99 | 26,31 | 37,27 | 27,35 | 31,46 | 1,10E+01 |
| Cl (mg/L C) | 12 | 21,16 | 22,61 | 24,06 | 2,29 | 22,62 | 18,56 | 26,45 | 21,99 | 24,09 | 5,23E+00 |
| COT (mg/L C) | 12 | 4,99 | 7,25 | 9,51 | 3,56 | 5,75 | 3,68 | 13,83 | 5,04 | 9,19 | 1,27E+01 |
| SS (mg/L) | 12 | 7,5 | 74,9 | 142,4 | 106,2 | 23,1 | 7,6 | 336,4 | 15,0 | 110,2 | 1,13E+04 |
| SV (mg/L) | 12 | 4,3 | 19,3 | 34,3 | 23,6 | 7,0 | 0,0 | 72,7 | 6,4 | 30,2 | 5,57E+02 |
| Cu (mg/L Cu) | 12 | 0,040 | 0,047 | 0,054 | 0,011 | 0,048 | 0,030 | 0,066 | 0,041 | 0,052 | 1,19E-04 |
| Pb (mg/L Pb) | 12 | 0,007 | 0,008 | 0,009 | 0,002 | 0,008 | 0,005 | 0,011 | 0,007 | 0,010 | 3,88E-06 |
| Cd (mg/L Cd) | 12 | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,001 | 0,002 | 0,001 | 0,004 | 0,002 | 0,003 | 6,48E-07 |
| Zn (mg/L Zn) | 12 | 0,091 | 0,185 | 0,280 | 0,149 | 0,138 | 0,046 | 0,524 | 0,090 | 0,248 | 2,22E-02 |
| Σ Metales (mg/L) | 12 | 0,142 | 0,243 | 0,343 | 0,158 | 0,195 | 0,084 | 0,597 | 0,144 | 0,306 | 2,49E-02 |

Tabla C II.24. Estudio estadístico del transecto H2 de la Ría de Huelva

| H2 | N Válidos | IntConf. -95% | Media | IntConf. +95% | Desv. Est. | Mediana | Mínimo | Máximo | Cuartil Inferior | Cuartil Superior | Varianza |
|------------------------------------|--------------|------------------|-------|------------------|---------------|---------|--------|--------|---------------------|---------------------|----------|
| pH | 12 | 7,85 | 7,97 | 8,09 | 0,19 | 7,91 | 7,76 | 8,31 | 7,82 | 8,11 | 3,71E-02 |
| T (°C) | 12 | 14,4 | 17,3 | 20,2 | 4,6 | 17,7 | 11,9 | 22,2 | 12,7 | 21,6 | 2,08E+01 |
| S | 12 | 35,0 | 36,0 | 37,1 | 1,6 | 36,5 | 32,0 | 37,5 | 35,0 | 37,3 | 2,61E+00 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 12 | 0,028 | 0,051 | 0,075 | 0,036 | 0,043 | 0,004 | 0,111 | 0,022 | 0,077 | 1,33E-03 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 12 | 0,012 | 0,022 | 0,032 | 0,016 | 0,019 | 0,007 | 0,049 | 0,008 | 0,033 | 2,54E-04 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 12 | 0,043 | 0,074 | 0,105 | 0,049 | 0,076 | 0,000 | 0,138 | 0,037 | 0,116 | 2,40E-03 |
| ΣN (mg/L N) | 12 | 0,103 | 0,148 | 0,193 | 0,070 | 0,136 | 0,068 | 0,242 | 0,078 | 0,222 | 4,95E-03 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 12 | 0,075 | 0,097 | 0,119 | 0,035 | 0,102 | 0,053 | 0,180 | 0,068 | 0,109 | 1,19E-03 |
| P total (mg/L P) | 12 | 0,139 | 0,299 | 0,460 | 0,253 | 0,213 | 0,076 | 0,989 | 0,134 | 0,368 | 6,38E-02 |
| Si (mg/L Si-SiO ₄) | 9 | 0,033 | 0,058 | 0,083 | 0,033 | 0,038 | 0,028 | 0,126 | 0,033 | 0,077 | 1,06E-03 |
| CT (mg/L C) | 12 | 27,61 | 32,09 | 36,57 | 7,06 | 29,37 | 27,26 | 51,42 | 27,98 | 32,95 | 4,98E+01 |
| Cl (mg/L C) | 12 | 23,14 | 24,65 | 26,16 | 2,37 | 24,03 | 20,85 | 29,54 | 23,61 | 25,00 | 5,62E+00 |
| COT (mg/L C) | 12 | 3,87 | 7,44 | 11,01 | 5,62 | 5,41 | 3,17 | 22,63 | 4,25 | 8,16 | 3,16E+01 |
| SS (mg/L) | 11 | 16,6 | 61,1 | 105,5 | 66,2 | 23,0 | 11,0 | 185,0 | 13,0 | 115,0 | 4,38E+03 |
| SV (mg/L) | 11 | 7,0 | 19,6 | 32,2 | 18,8 | 9,0 | 6,0 | 60,0 | 6,9 | 38,0 | 3,54E+02 |
| Cu (mg/L Cu) | 12 | 0,029 | 0,041 | 0,053 | 0,019 | 0,035 | 0,028 | 0,096 | 0,030 | 0,045 | 3,56E-04 |
| Pb (mg/L Pb) | 12 | 0,006 | 0,009 | 0,013 | 0,006 | 0,008 | 0,004 | 0,025 | 0,005 | 0,010 | 3,37E-05 |
| Cd (mg/L Cd) | 12 | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,000 | 0,001 | 0,001 | 0,003 | 0,001 | 0,002 | 2,42E-07 |
| Zn (mg/L Zn) | 12 | 0,061 | 0,117 | 0,173 | 0,088 | 0,072 | 0,043 | 0,300 | 0,056 | 0,180 | 7,78E-03 |
| Σ Metales (mg/L) | 12 | 0,104 | 0,169 | 0,234 | 0,103 | 0,110 | 0,082 | 0,363 | 0,094 | 0,269 | 1,05E-02 |

Tabla C II.25. Estudio estadístico del transecto H3 de la Ría de Huelva

| H3 | N Válidos | IntConf. -95% | Media | IntConf. +95% | Desv. Est. | Mediana | Mínimo | Máximo | Cuartil Inferior | Cuartil Superior | Varianza |
|------------------------------------|----------------------|--------------------------|--------------|--------------------------|-----------------------|----------------|---------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| pH | 12 | 7,99 | 8,07 | 8,16 | 0,13 | 8,03 | 7,95 | 8,31 | 7,97 | 8,17 | 1,95E-02 |
| T (°C) | 12 | 14,6 | 16,9 | 19,1 | 3,5 | 17,1 | 12,5 | 20,8 | 13,6 | 20,0 | 1,16E+01 |
| S | 12 | 36,0 | 37,0 | 37,9 | 1,6 | 37,3 | 35,0 | 39,0 | 35,5 | 38,3 | 2,25E+00 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 12 | 0,009 | 0,018 | 0,026 | 0,013 | 0,020 | 0,001 | 0,038 | 0,003 | 0,029 | 1,57E-04 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 12 | 0,004 | 0,009 | 0,014 | 0,008 | 0,005 | 0,001 | 0,024 | 0,003 | 0,016 | 6,08E-05 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 12 | 0,029 | 0,049 | 0,069 | 0,032 | 0,053 | 0,003 | 0,105 | 0,023 | 0,070 | 9,80E-04 |
| ΣN (mg/L N) | 12 | 0,054 | 0,076 | 0,098 | 0,035 | 0,079 | 0,036 | 0,140 | 0,042 | 0,098 | 1,16E-03 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 12 | 0,035 | 0,043 | 0,050 | 0,011 | 0,045 | 0,025 | 0,063 | 0,033 | 0,050 | 1,39E-04 |
| P total (mg/L P) | 12 | 0,135 | 0,200 | 0,264 | 0,102 | 0,170 | 0,093 | 0,395 | 0,120 | 0,270 | 9,85E-03 |
| Si (mg/L Si-SiO ₄) | 9 | 0,008 | 0,044 | 0,080 | 0,046 | 0,024 | 0,000 | 0,120 | 0,008 | 0,086 | 2,16E-03 |
| CT (mg/L C) | 12 | 28,56 | 30,77 | 32,97 | 3,47 | 29,49 | 27,62 | 39,92 | 28,78 | 31,48 | 1,12E+01 |
| CI (mg/L C) | 12 | 22,82 | 23,81 | 24,79 | 1,55 | 24,34 | 20,47 | 25,34 | 23,22 | 24,77 | 2,22E+00 |
| COT (mg/L C) | 12 | 4,01 | 6,96 | 9,92 | 4,65 | 4,99 | 2,83 | 17,62 | 4,50 | 8,73 | 2,01E+01 |
| SS (mg/L) | 12 | 19,0 | 58,2 | 97,4 | 61,7 | 29,3 | 12,0 | 168,0 | 20,5 | 95,0 | 3,67E+03 |
| SV (mg/L) | 12 | 11,0 | 19,3 | 27,5 | 13,0 | 12,0 | 8,0 | 40,0 | 10,0 | 31,5 | 1,62E+02 |
| Cu (mg/L Cu) | 12 | 0,019 | 0,024 | 0,029 | 0,007 | 0,023 | 0,016 | 0,041 | 0,017 | 0,029 | 5,23E-05 |
| Pb (mg/L Pb) | 12 | 0,004 | 0,006 | 0,007 | 0,002 | 0,005 | 0,004 | 0,010 | 0,004 | 0,007 | 3,75E-06 |
| Cd (mg/L Cd) | 12 | 0,000 | 0,001 | 0,001 | 0,000 | 0,001 | 0,000 | 0,001 | 0,000 | 0,001 | 3,25E-08 |
| Zn (mg/L Zn) | 12 | 0,032 | 0,057 | 0,082 | 0,039 | 0,038 | 0,024 | 0,131 | 0,032 | 0,080 | 1,40E-03 |
| Σ Metales (mg/L) | 12 | 0,058 | 0,087 | 0,117 | 0,046 | 0,065 | 0,043 | 0,183 | 0,058 | 0,115 | 2,02E-03 |

Tabla C II.26. Estudio estadístico del transecto H4 de la Ría de Huelva

| H4 | N Válidos | IntConf. -95% | Media | IntConf. +95% | Desv. Est. | Mediana | Mínimo | Máximo | Cuartil Inferior | Cuartil Superior | Varianza |
|------------------------------------|----------------------|--------------------------|--------------|--------------------------|-----------------------|----------------|---------------|---------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------|
| pH | 12 | 8,06 | 8,16 | 8,26 | 0,15 | 8,13 | 7,94 | 8,39 | 8,05 | 8,31 | 2,29E-02 |
| T (°C) | 12 | 14,9 | 17,7 | 20,5 | 4,3 | 17,8 | 13,1 | 22,6 | 13,4 | 21,8 | 1,74E+01 |
| S | 12 | 36,2 | 37,2 | 38,2 | 1,6 | 37,3 | 35,0 | 40,0 | 36,0 | 38,3 | 2,11E+00 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 12 | 0,007 | 0,014 | 0,021 | 0,011 | 0,015 | 0,000 | 0,027 | 0,002 | 0,025 | 1,16E-04 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 12 | 0,002 | 0,004 | 0,007 | 0,004 | 0,004 | 0,000 | 0,014 | 0,001 | 0,005 | 1,45E-05 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 12 | 0,032 | 0,087 | 0,142 | 0,087 | 0,049 | 0,010 | 0,262 | 0,018 | 0,140 | 6,68E-03 |
| ΣN (mg/L N) | 12 | 0,045 | 0,105 | 0,165 | 0,094 | 0,071 | 0,011 | 0,293 | 0,028 | 0,172 | 7,99E-03 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 12 | 0,019 | 0,023 | 0,027 | 0,006 | 0,020 | 0,018 | 0,033 | 0,018 | 0,031 | 3,27E-05 |
| P total (mg/L P) | 12 | 0,150 | 0,271 | 0,391 | 0,189 | 0,229 | 0,051 | 0,560 | 0,112 | 0,461 | 4,95E-02 |
| Si (mg/L Si-SiO ₄) | 9 | -0,006 | 0,072 | 0,149 | 0,101 | 0,020 | 0,000 | 0,284 | 0,000 | 0,145 | 1,02E-02 |
| CT (mg/L C) | 12 | 29,68 | 31,89 | 34,10 | 3,48 | 30,72 | 29,32 | 40,98 | 29,60 | 33,18 | 1,07E+01 |
| CI (mg/L C) | 12 | 23,63 | 24,72 | 25,81 | 1,71 | 25,30 | 21,00 | 26,38 | 24,17 | 25,79 | 2,53E+00 |
| COT (mg/L C) | 12 | 4,10 | 7,17 | 10,24 | 4,82 | 4,88 | 3,53 | 17,76 | 4,38 | 9,24 | 2,05E+01 |
| SS (mg/L) | 12 | 13,8 | 64,0 | 114,2 | 79,0 | 23,0 | 11,1 | 221,0 | 14,6 | 109,4 | 5,58E+03 |
| SV (mg/L) | 12 | 8,5 | 21,2 | 34,0 | 20,0 | 10,5 | 4,1 | 68,0 | 8,2 | 34,2 | 3,59E+02 |
| Cu (mg/L Cu) | 12 | 0,012 | 0,015 | 0,018 | 0,005 | 0,015 | 0,009 | 0,024 | 0,010 | 0,019 | 2,19E-05 |
| Pb (mg/L Pb) | 12 | 0,003 | 0,004 | 0,005 | 0,002 | 0,003 | 0,002 | 0,007 | 0,002 | 0,006 | 2,27E-06 |
| Cd (mg/L Cd) | 12 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | 0,001 | 0,000 | 0,000 | 1,20E-08 |
| Zn (mg/L Zn) | 12 | 0,019 | 0,025 | 0,032 | 0,011 | 0,025 | 0,013 | 0,046 | 0,016 | 0,033 | 9,69E-05 |
| Σ Metales (mg/L) | 12 | 0,034 | 0,044 | 0,055 | 0,016 | 0,048 | 0,025 | 0,077 | 0,028 | 0,053 | 2,31E-04 |

Tabla C II.27. Estudio estadístico del transecto H5 de la Ría de Huelva

| H5 | N Válidos | IntConf. -95% | Media | IntConf. +95% | Desv. Est. | Mediana | Mínimo | Máximo | Cuartil Inferior | Cuartil Superior | Varianza |
|------------------------------------|--------------|------------------|-------|------------------|---------------|---------|--------|--------|---------------------|---------------------|----------|
| pH | 18 | 7,84 | 7,92 | 8,01 | 0,18 | 7,98 | 7,61 | 8,18 | 7,79 | 8,07 | 3,07E-02 |
| T (°C) | 18 | 16,4 | 18,8 | 21,1 | 4,7 | 21,3 | 11,4 | 23,4 | 13,0 | 22,3 | 2,25E+01 |
| S | 18 | 36,1 | 36,7 | 37,2 | 1,2 | 36,8 | 35,0 | 39,0 | 36,0 | 37,0 | 1,32E+00 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 18 | 0,020 | 0,049 | 0,078 | 0,059 | 0,027 | 0,002 | 0,213 | 0,009 | 0,074 | 3,45E-03 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 18 | 0,006 | 0,016 | 0,026 | 0,020 | 0,008 | 0,000 | 0,070 | 0,004 | 0,018 | 3,94E-04 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 18 | 0,082 | 0,104 | 0,125 | 0,044 | 0,104 | 0,008 | 0,169 | 0,078 | 0,135 | 1,90E-03 |
| ΣN (mg/L N) | 18 | 0,118 | 0,169 | 0,220 | 0,103 | 0,152 | 0,010 | 0,412 | 0,092 | 0,198 | 1,05E-02 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 18 | 0,045 | 0,073 | 0,101 | 0,057 | 0,064 | 0,015 | 0,203 | 0,027 | 0,092 | 3,20E-03 |
| P total (mg/L P) | 18 | 0,147 | 0,242 | 0,337 | 0,190 | 0,198 | 0,052 | 0,723 | 0,122 | 0,278 | 3,61E-02 |
| Si (mg/L Si-SiO ₄) | 18 | 0,046 | 0,161 | 0,276 | 0,232 | 0,093 | 0,000 | 0,784 | 0,023 | 0,153 | 5,37E-02 |
| CT (mg/L C) | 18 | 27,71 | 31,63 | 35,54 | 7,87 | 30,65 | 21,55 | 59,37 | 27,57 | 31,87 | 6,20E+01 |
| Cl (mg/L C) | 18 | 22,35 | 23,89 | 25,42 | 3,09 | 24,38 | 17,75 | 31,54 | 21,73 | 25,58 | 9,54E+00 |
| COT (mg/L C) | 18 | 4,73 | 7,74 | 10,75 | 6,05 | 5,32 | 2,70 | 27,83 | 4,77 | 8,44 | 3,66E+01 |
| SS (mg/L) | 18 | 34,3 | 74,2 | 114,0 | 80,2 | 23,5 | 7,0 | 194,2 | 10,8 | 178,0 | 6,42E+03 |
| SV (mg/L) | 18 | 11,8 | 20,8 | 29,7 | 18,0 | 8,5 | 4,8 | 50,7 | 6,8 | 40,0 | 3,25E+02 |
| Cu (mg/L Cu) | 18 | 0,026 | 0,038 | 0,051 | 0,025 | 0,035 | 0,007 | 0,091 | 0,017 | 0,062 | 6,28E-04 |
| Pb (mg/L Pb) | 18 | 0,004 | 0,006 | 0,009 | 0,004 | 0,006 | 0,002 | 0,017 | 0,003 | 0,007 | 1,74E-05 |
| Cd (mg/L Cd) | 18 | 0,001 | 0,002 | 0,002 | 0,001 | 0,001 | 0,000 | 0,004 | 0,000 | 0,003 | 2,02E-06 |
| Zn (mg/L Zn) | 18 | 0,055 | 0,145 | 0,235 | 0,180 | 0,076 | 0,011 | 0,645 | 0,027 | 0,240 | 3,25E-02 |
| Σ Metales (mg/L) | 18 | 0,091 | 0,192 | 0,292 | 0,203 | 0,125 | 0,020 | 0,746 | 0,048 | 0,282 | 4,11E-02 |

Tabla C II.28. Estudio estadístico de la Ría de Huelva

| Ría de Huelva | N Válidos | IntConf. -95% | Media | IntConf. +95% | Desv. Est. | Mediana | Mínimo | Máximo | Cuartil Inferior | Cuartil Superior | Varianza |
|------------------------------------|--------------|------------------|-------|------------------|---------------|---------|--------|--------|---------------------|---------------------|----------|
| pH | 66 | 7,94 | 7,99 | 8,04 | 0,20 | 7,99 | 7,59 | 8,39 | 7,82 | 8,10 | 4,24E-02 |
| T (°C) | 66 | 16,7 | 17,8 | 18,9 | 4,4 | 20,0 | 11,4 | 23,4 | 13,1 | 21,9 | 1,91E+01 |
| S | 66 | 36,3 | 36,7 | 37,0 | 1,4 | 37,0 | 32,0 | 40,0 | 36,0 | 37,5 | 1,98E+00 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 66 | 0,028 | 0,038 | 0,048 | 0,040 | 0,026 | 0,000 | 0,213 | 0,010 | 0,052 | 1,56E-03 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 66 | 0,012 | 0,016 | 0,020 | 0,017 | 0,009 | 0,000 | 0,070 | 0,004 | 0,024 | 2,82E-04 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 66 | 0,069 | 0,083 | 0,097 | 0,058 | 0,080 | 0,000 | 0,262 | 0,032 | 0,116 | 3,32E-03 |
| ΣN (mg/L N) | 66 | 0,116 | 0,137 | 0,158 | 0,087 | 0,117 | 0,010 | 0,412 | 0,078 | 0,195 | 7,51E-03 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 66 | 0,060 | 0,071 | 0,083 | 0,048 | 0,057 | 0,015 | 0,203 | 0,028 | 0,107 | 2,30E-03 |
| P total (mg/L P) | 66 | 0,224 | 0,273 | 0,322 | 0,201 | 0,211 | 0,051 | 0,989 | 0,130 | 0,373 | 4,23E-02 |
| Si (mg/L Si-SiO ₄) | 54 | 0,067 | 0,111 | 0,156 | 0,163 | 0,068 | 0,000 | 0,784 | 0,020 | 0,126 | 2,66E-02 |
| CT (mg/L C) | 66 | 29,91 | 31,28 | 32,65 | 5,59 | 29,95 | 21,55 | 59,37 | 28,32 | 31,87 | 3,00E+01 |
| Cl (mg/L C) | 66 | 23,34 | 23,93 | 24,52 | 2,40 | 24,28 | 17,75 | 31,54 | 22,53 | 25,33 | 5,57E+00 |
| COT (mg/L C) | 66 | 6,13 | 7,35 | 8,57 | 4,97 | 5,27 | 2,70 | 27,83 | 4,43 | 8,44 | 2,39E+01 |
| SS (mg/L) | 65 | 47,9 | 67,3 | 86,6 | 78,1 | 24,0 | 7,0 | 336,4 | 13,3 | 154,0 | 5,95E+03 |
| SV (mg/L) | 65 | 15,6 | 20,1 | 24,6 | 18,3 | 10,0 | 0,0 | 72,7 | 7,0 | 39,0 | 3,26E+02 |
| Cu (mg/L Cu) | 66 | 0,029 | 0,034 | 0,038 | 0,020 | 0,029 | 0,007 | 0,096 | 0,018 | 0,045 | 3,87E-04 |
| Pb (mg/L Pb) | 66 | 0,006 | 0,007 | 0,008 | 0,004 | 0,006 | 0,002 | 0,025 | 0,004 | 0,008 | 1,53E-05 |
| Cd (mg/L Cd) | 66 | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,001 | 0,001 | 0,000 | 0,004 | 0,000 | 0,002 | 1,18E-06 |
| Zn (mg/L Zn) | 66 | 0,077 | 0,109 | 0,142 | 0,131 | 0,057 | 0,011 | 0,645 | 0,030 | 0,129 | 1,66E-02 |
| Σ Metales (mg/L) | 66 | 0,114 | 0,151 | 0,187 | 0,149 | 0,094 | 0,020 | 0,746 | 0,054 | 0,183 | 2,15E-02 |

4.1.3. HISTOGRAMAS DE FRECUENCIAS. DIAGRAMAS DE DATOS ORDENADOS. DIAGRAMAS DE BOX-WHISKERS.

Se han representado los histogramas de frecuencia, diagramas de datos ordenados y diagramas de box-whiskers de las variables más importantes medidas en la Ría de Huelva. Para la elaboración de los histogramas se han seguido las directrices marcadas por la *Guía para la evaluación de la calidad de los datos* publicada por la Oficina de Investigación y Desarrollo de la USEPA (USEPA, 1998).

Los histogramas de frecuencia de cada parámetro se han construido a partir de un total de 66 casos divididos en 10 clases principales de intervalos regulares de concentración seleccionados en función del rango de concentraciones de cada parámetro.

La primera clase (Clase 0) de cada parámetro está formada por aquellas observaciones cuyos resultados han sido inferiores a los límites de detección de los métodos analíticos.

Los comentarios se han centrado en definir los límites o las clases en las cuales se concentran la mayor parte de las observaciones. Para ello, se indicarán las concentraciones que aglutinan el 50, 75 y 95 % de las observaciones. En la mayoría de los casos, estos porcentajes no coincidirán con los exactamente indicados y por tanto, se indicarán las clases que más se aproximan a dichos porcentajes.

Para aquellos parámetros incluidos en las diversas legislaciones de calidad de agua, se han realizado las representaciones en las mismas expresiones de concentración que las referidas en la legislación. Por ejemplo, para el caso del *amonio*, las unidades son de mg/L NH₄⁺.

Los diagramas de box-whisker están definidos por la mediana, los cuartiles superiores e inferiores (75% y 25%), y por los máximos y mínimos excluyendo los valores anómalos. Los valores anómalos se han representado por un círculo, y los valores extremos por un asterisco.

Los valores que se encuentran muy alejados de la zona central de la distribución son considerados valores anómalos o valores extremos según cumplan las condiciones que se muestran a continuación:

Valores anómalos. Para las representaciones realizadas, se considerará un valor anómalo aquel que cumpla alguna de las siguientes condiciones:

$$\text{Valor} > \text{UBV} + \text{o.c.} * (\text{UBV} - \text{LBV})$$

$$\text{Valor} < \text{LBV} - \text{o.c.} * (\text{UBV} - \text{LBV})$$

Valores extremos. Para las representaciones realizadas, se considerará un valor extremo aquel que cumpla alguna de las siguientes condiciones:

$$\text{Valor} > \text{UBV} + 2 * \text{o.c.} * (\text{UBV} - \text{LBV})$$

$$\text{Valor} < \text{LBV} - 2 * \text{o.c.} * (\text{UBV} - \text{LBV})$$

Donde *UBV* (Upper Box Value) es el valor que define el extremo superior de la caja. En nuestro caso es la media + el percentil superior o 75%; *LBV* (Lower Box Value) es el valor que define el extremo inferior de la caja. En nuestro caso es la media + el percentil inferior o 25%; *o.c.* (outlier coefficient) es el coeficiente del valor anómalo especificado. En nuestro caso es 1,5.

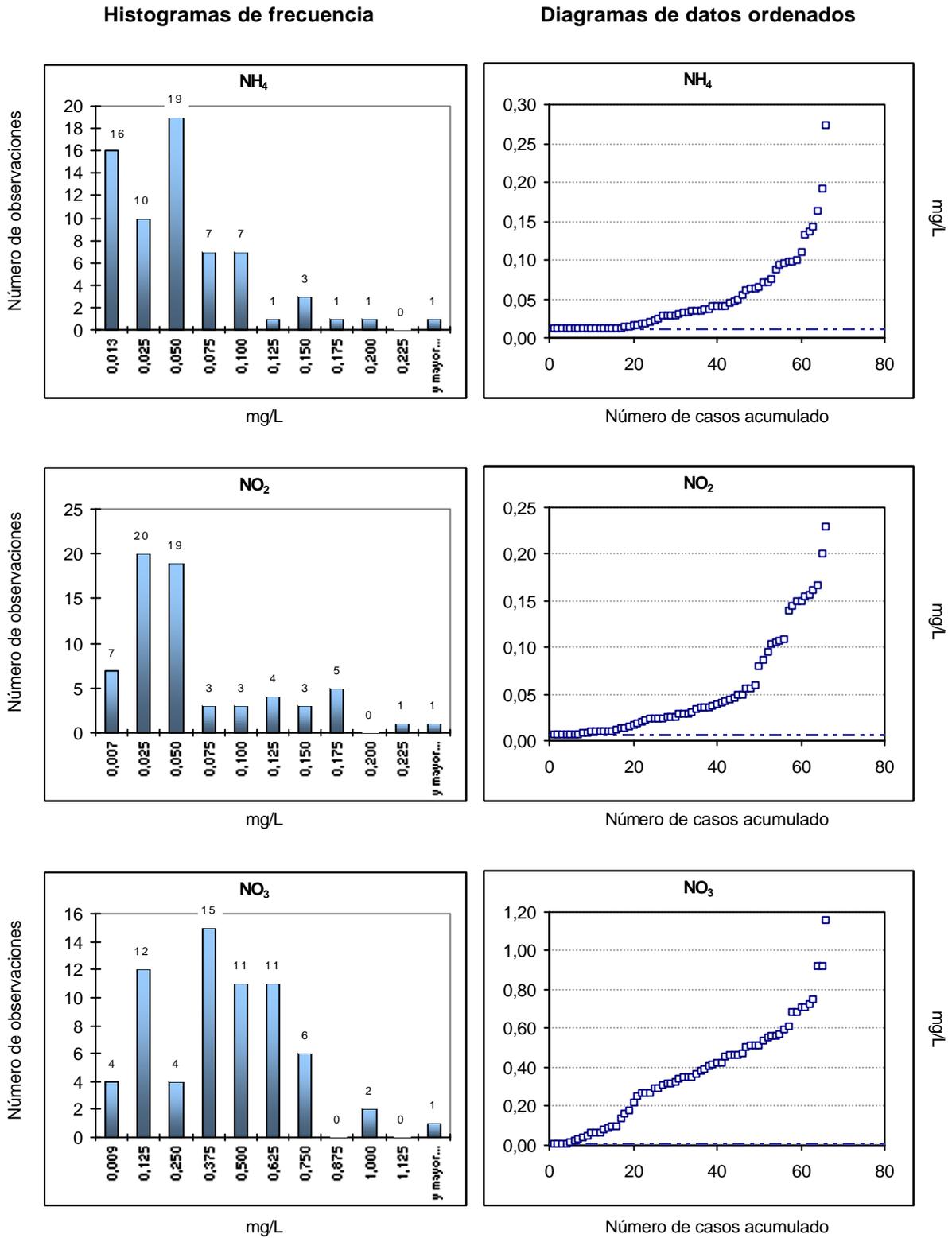


Figura C II.3.
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍA DE HUELVA

Diagramas de Box-Whisker

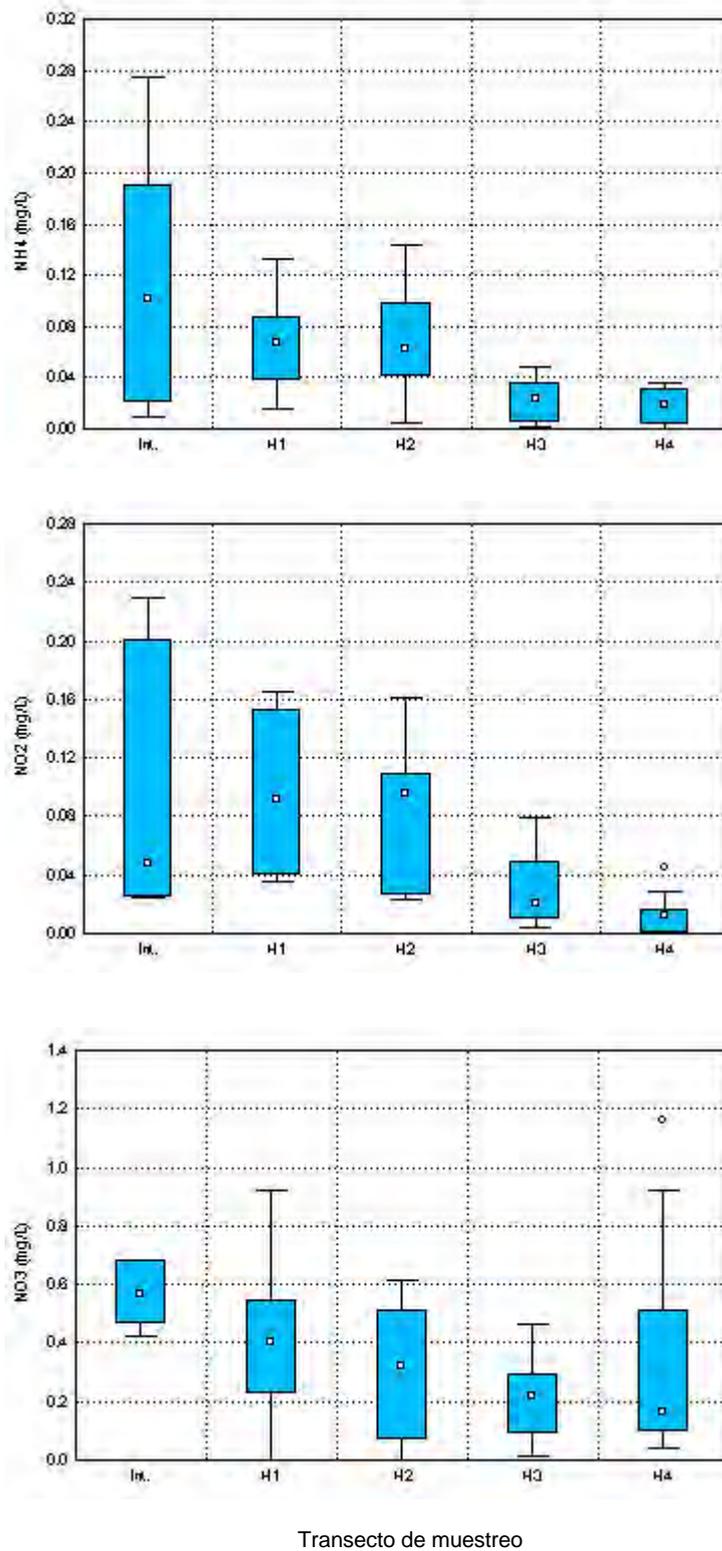


Figura C II.3. (Cont)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍA DE HUELVA

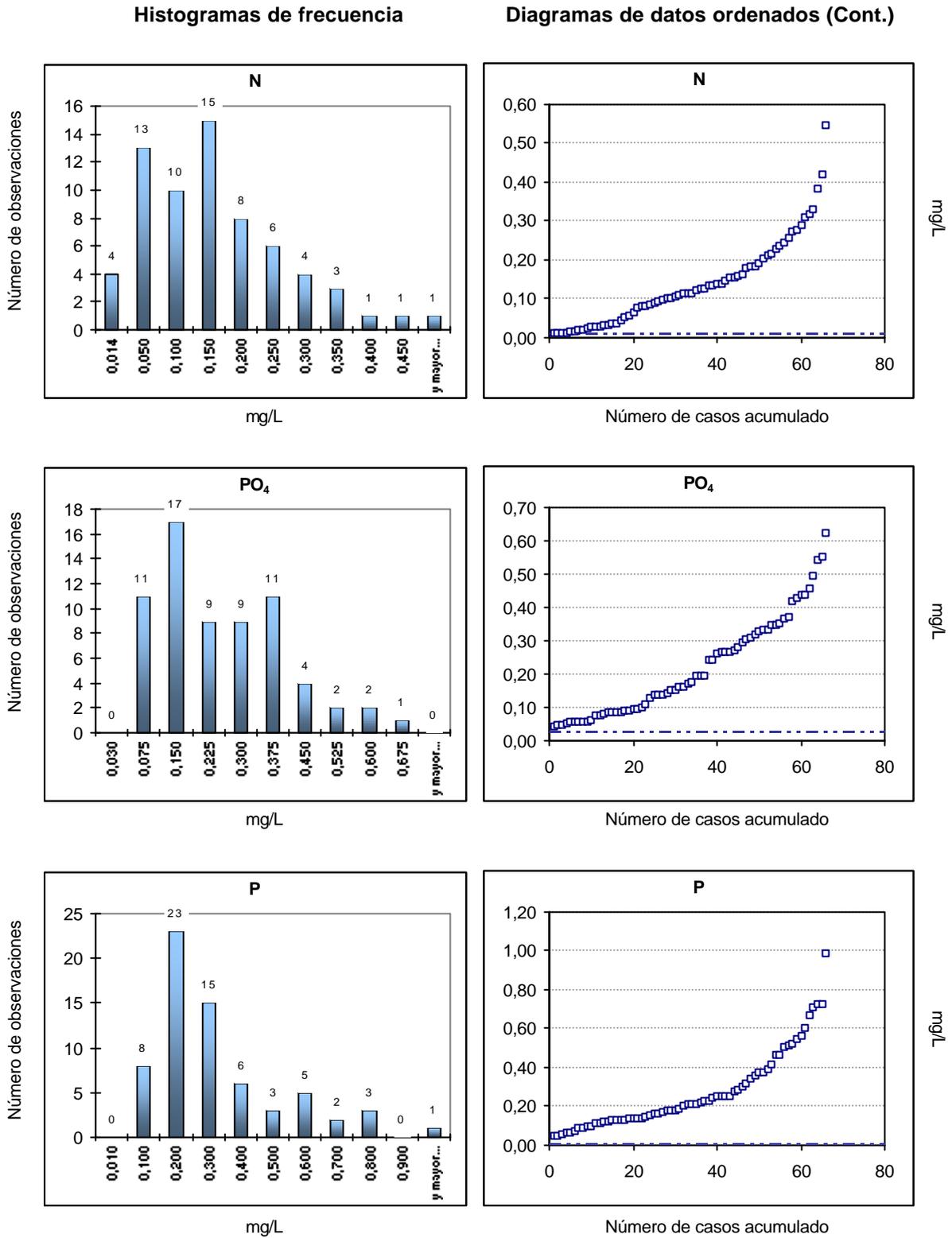


Figura C II.3. (Cont)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍA DE HUELVA

Diagramas de Box-Whisker (Cont.)

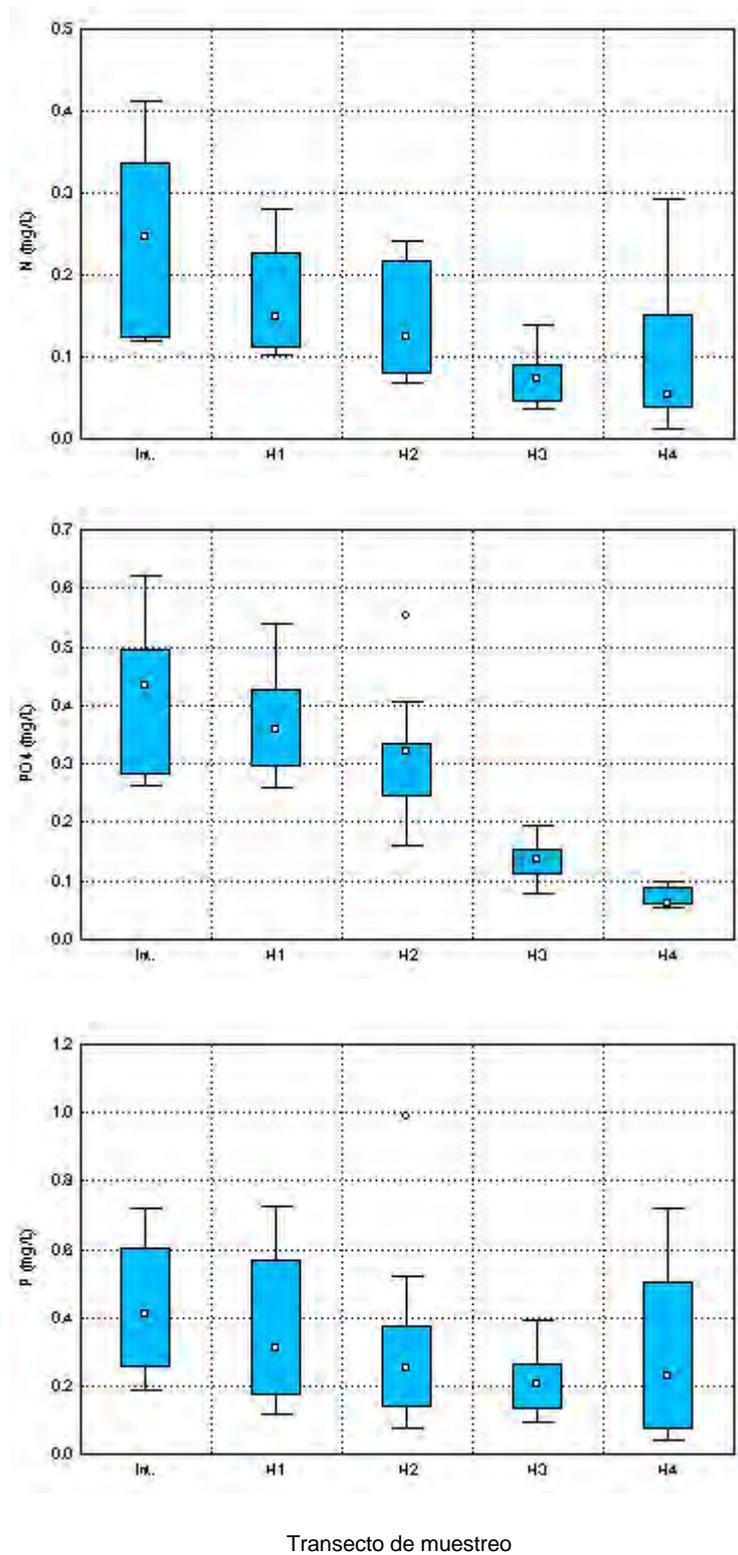


Figura C II.3. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍA DE HUELVA

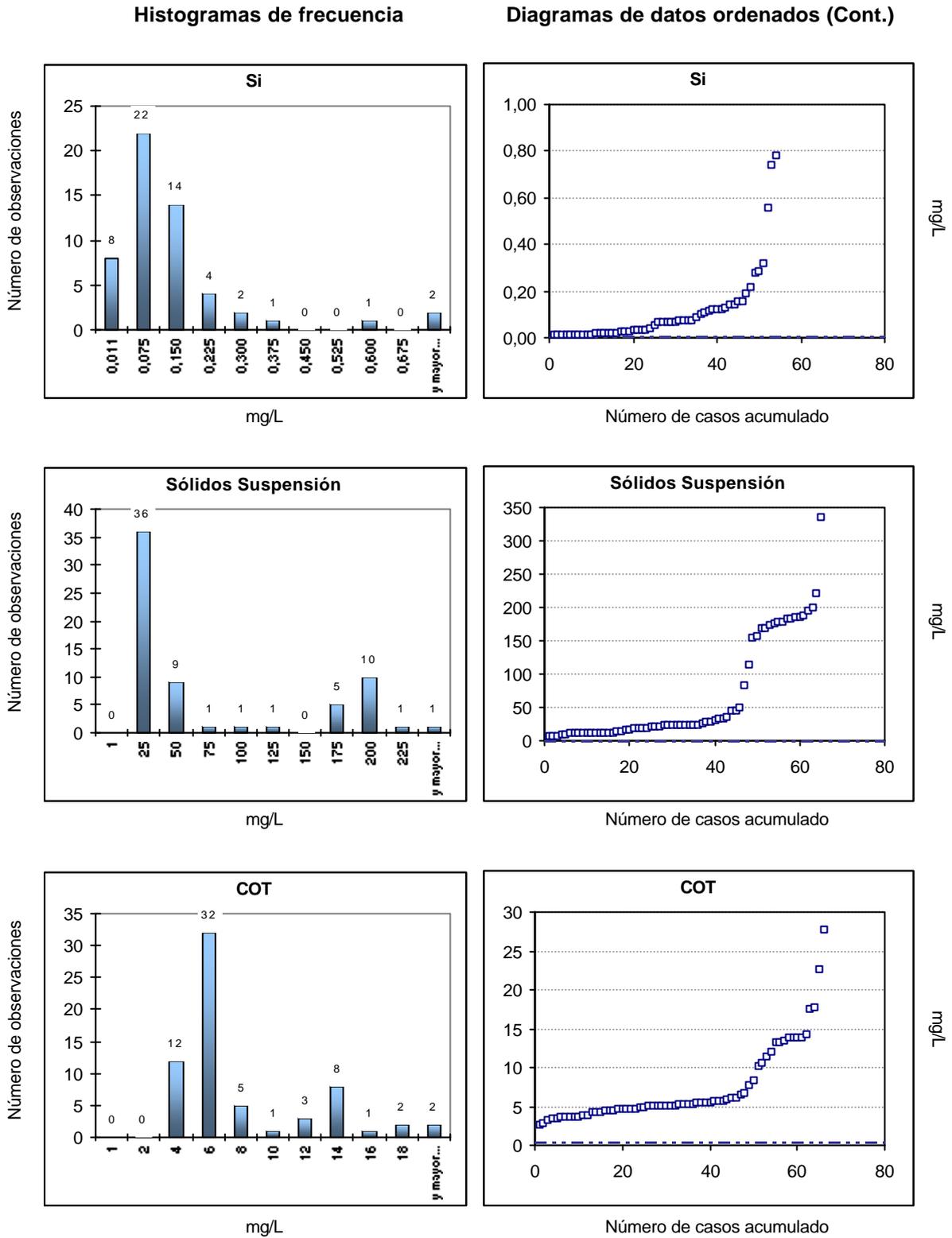


Figura C II.3. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍA DE HUELVA

Diagramas de Box-Whisker (Cont.)

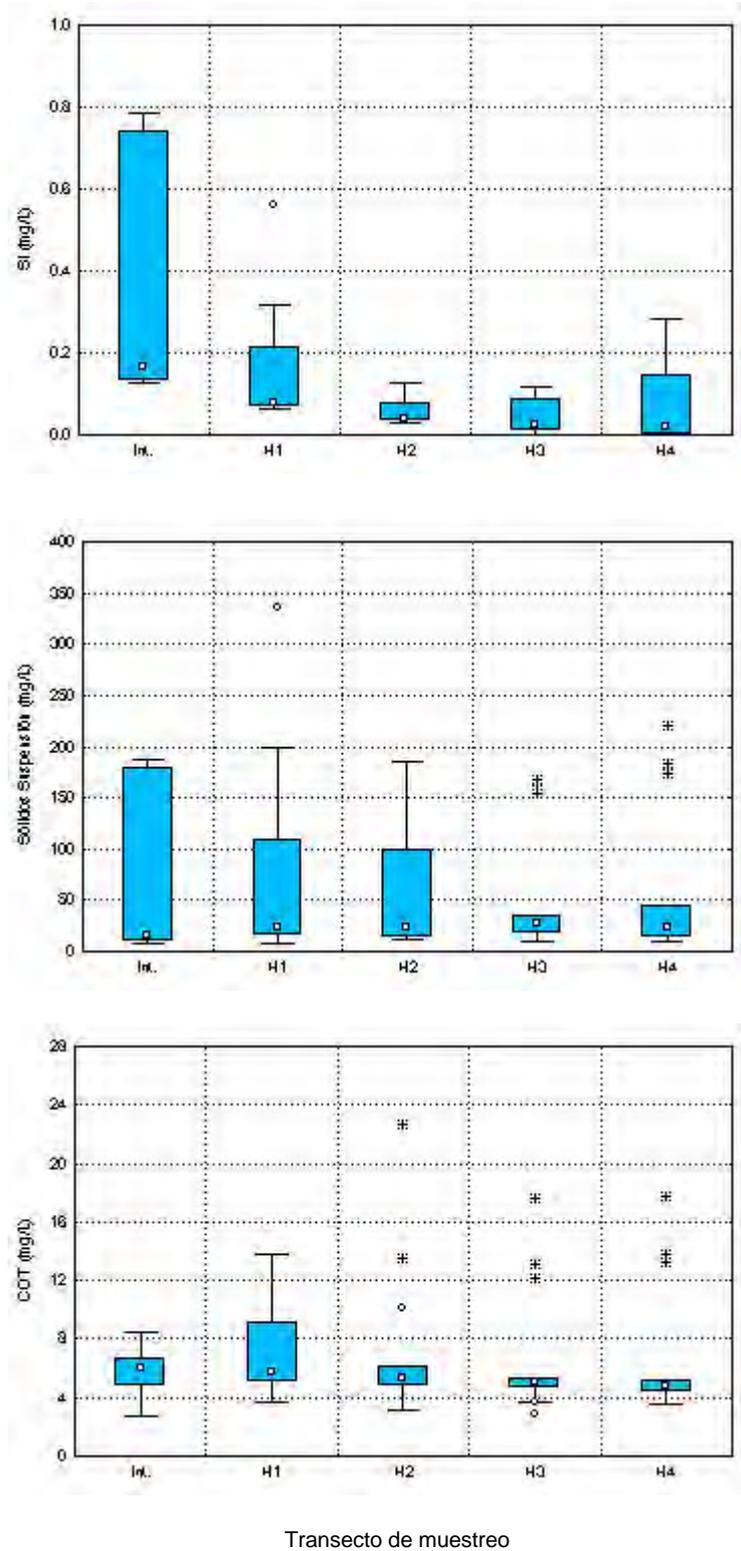


Figura C II.3. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍA DE HUELVA

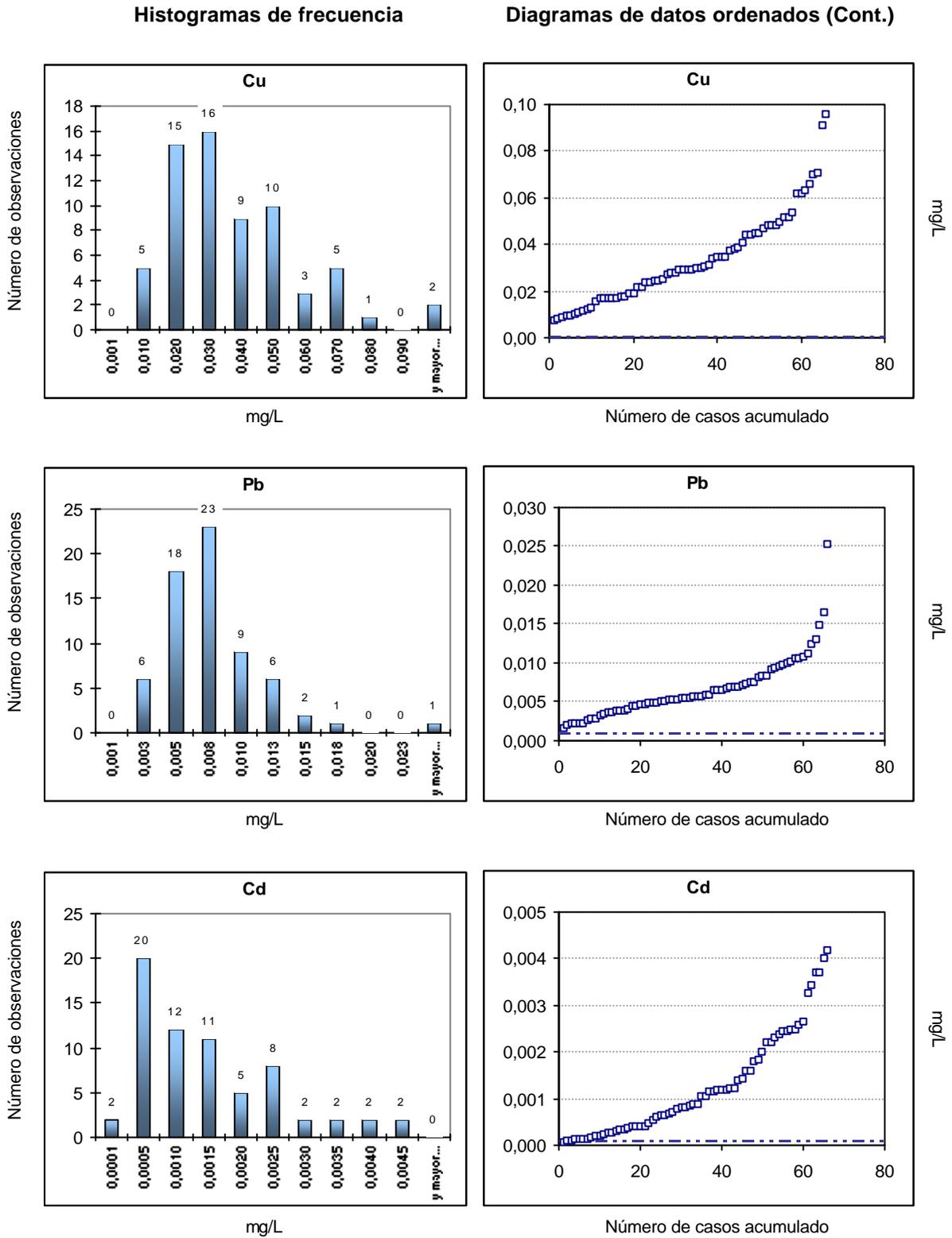


Figura C II.3. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍA DE HUELVA

Diagramas de Box-Whisker (Cont.)

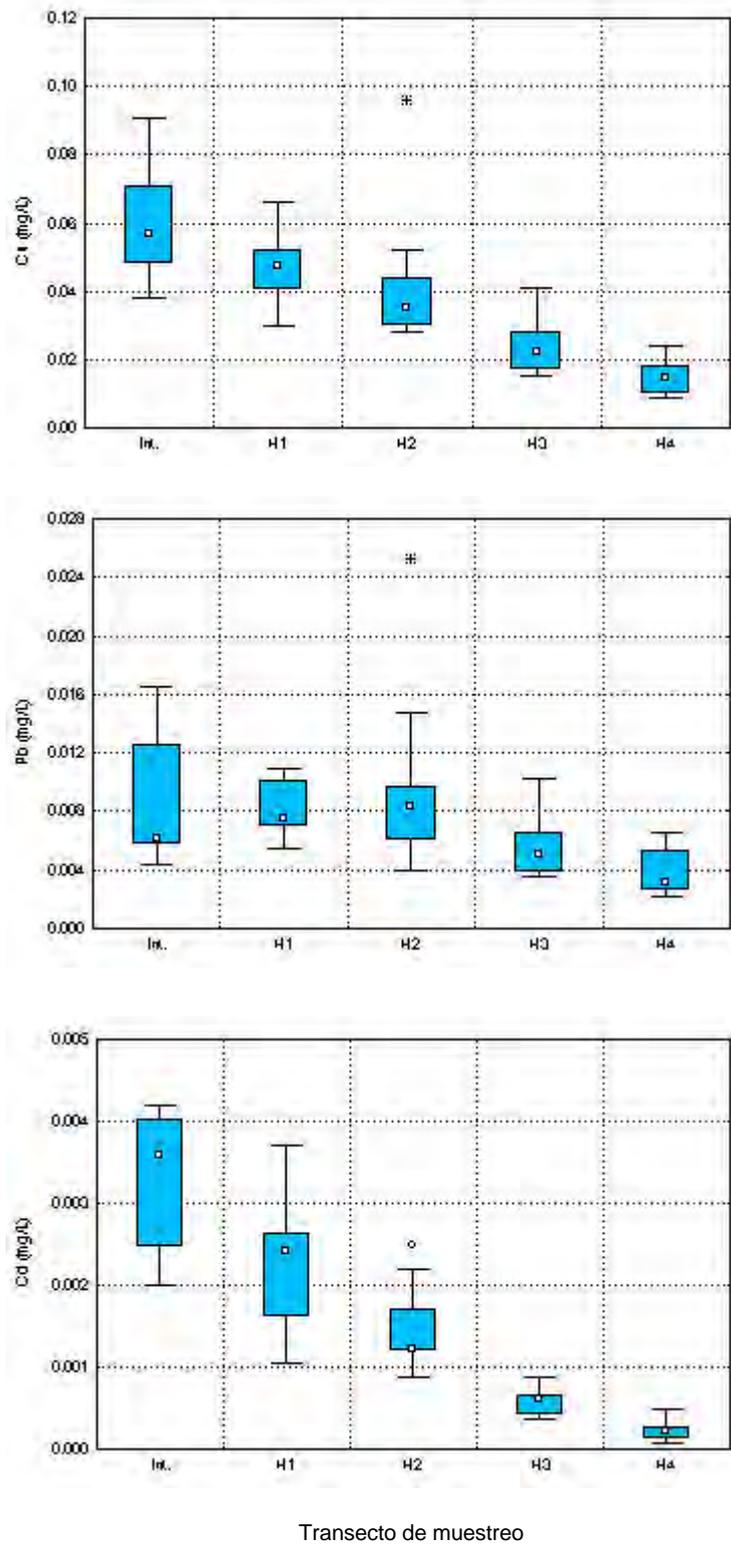


Figura C II.3. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍA DE HUELVA

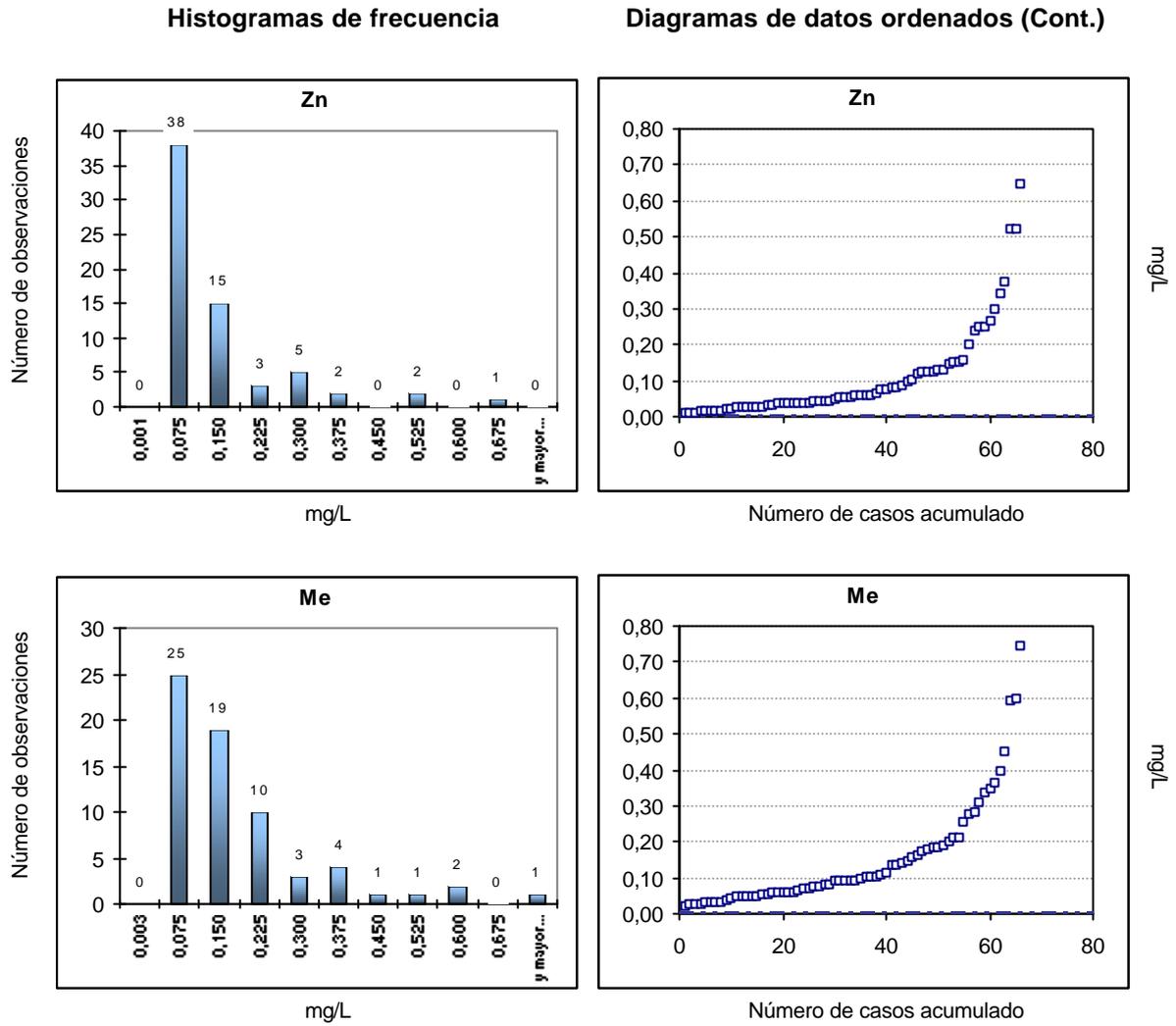


Figura C II.3. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍA DE HUELVA

Diagramas de Box-Whisker (Cont.)

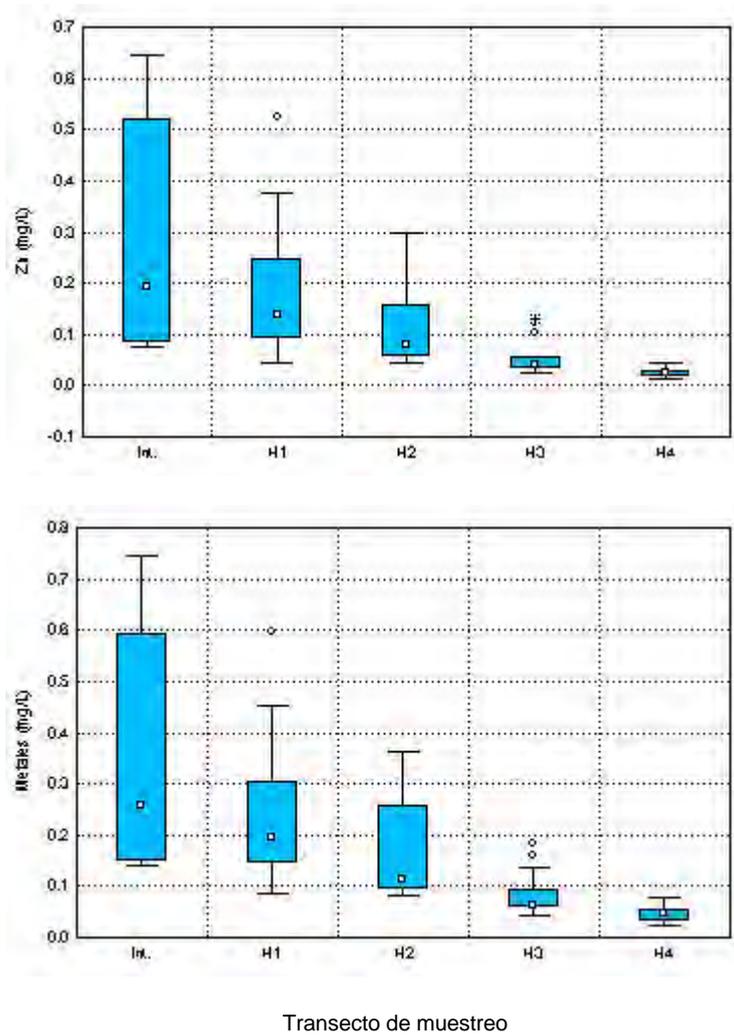


Figura C II.3.
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍA DE HUELVA

AMONIO

El histograma de frecuencia del parámetro *amonio* se ha construido a partir de un total de 66 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 25 µg/L NH₄⁺. La clase-0 incluye a todas las observaciones inferiores a 13 µg/L. La clase-10 incluye todas aquellas observaciones superiores a 225 µg/L. Como se puede apreciar gráficamente, 16 casos los cuales representan un 24% de las observaciones se han clasificado como no-detectadas. La primera y segunda clase (hasta 50 µg/L) incluyen el 68% de los casos. El 79% incluye los primeros 75 µg/L y el 95% pertenecen a los primeros 150 µg/L.

El diagrama de datos ordenados nos da una visión gráfica de la distribución de los resultados (ver apartado de descripción de este tipo de diagramas). Así, la forma cóncava que toma la nube de puntos indica una distribución asimétrica, centrandos los resultados hacia valores no detectados (línea punteada) y hacia bajas concentraciones. Al comienzo de la representación se observa como la pendiente crece lentamente debido a una gran abundancia de valores inferiores a 50 µg/L para, a partir de este valor, crecer rápidamente para mostrar las mayores concentraciones.

Se ha representado mediante diagramas de box-whiskers la variación de los parámetros en cada una de las estaciones de muestreo. Con estas representaciones obtenemos dos tipos de información: (1) la variación espacial de cada parámetro a lo largo de la Ría de Huelva, y (2) la forma de la distribución en cada estación. En relación a la variación espacial de *amonio* se observa como existe un **descenso de las concentraciones de amonio a medida que las estaciones de muestreo se localizan hacia la desembocadura de la ría**. Las estaciones interiores correspondientes a las estaciones localizadas en los ríos Tinto y Odiel (H5F y H5E) son las que presentan mayores concentraciones siendo las estaciones de muestreo que contribuyen principalmente a concentraciones superiores a 125 µg/L NH₄⁺. Los transectos H1 y H2 muestran concentraciones similares claramente diferenciadas de los transectos H3 y H4 en los cuales los niveles están próximos a los límites de detección de este parámetro.

La altura de las cajas nos informan de la variabilidad del parámetro. Así pues, en las estaciones interiores se observa una alta variabilidad mientras que en el resto de las estaciones, la variación de concentración no es tan acusada. El tamaño de los whiskers indican la presencia de concentraciones altas y/o bajas no incluidas en nuestro caso en el rango cuartil y que son considerados como concentraciones incluidas dentro del rango válido de concentraciones (ver valores anómalos y extremos al comienzo de este apartado). De los whiskers calculados para el parámetro *amonio* cabe destacar el whisker superior perteneciente al diagrama de las estaciones interiores. Este whisker está condicionado por las mediciones realizadas en la estación localizada en el río Tinto (H5E) la cual presentó valores promedios globales el doble de las concentraciones de amonio medidas en el Odiel (H5F) (Tabla C II.21.).

NITRITOS

El histograma de frecuencias para la representación de *nitritos* se ha construido a partir de 66 casos clasificados en 10 clases de intervalos de 25 µg/L NO₂ cada una. La clase-0 está definida por la concentración de 7 µg/L NO₂ la cual es el límite de detección de este método analítico e incluye 7 casos no-detectados. La clase-10 incluye un caso superior a 225 µg/L. Los resultados muestran que la primera clase incluye el 41% de los resultados, la tercera clase de 75 µg/L se corresponde con el 75% y finalmente, los primeros 175 µg/L incluyen el 95% de los resultados. Notar que en los primeros 50 µg/L se centran gran parte de los casos.

En el diagrama de datos ordenados, se observan dos grupos de resultados, una nube de puntos de pendiente suave correspondiente a bajas concentraciones (hasta 50 µg/L), y un segundo grupo de observaciones de gran pendiente (a partir de 50 µg/L). En el diagrama de box-whisker se observa como

este segundo grupo está formado por los resultados obtenidos en los transectos interiores (H1 y H2) y en las estaciones localizadas en los ríos Tinto y Odiel.

Las representaciones de box-whisker muestran como, al igual que en el caso del amonio, existe un **descenso progresivo en el contenido de nitritos a medida que los transectos se localizan hacia la desembocadura de la ría**, hasta alcanzar valores próximos a los límites de detección del método analítico en el transecto H4. La forma de la distribución en cada transecto refleja amplias cajas, whiskers inferiores cortos, y whiskers superiores alargados. En el transecto H4 aparece un valor anómalo de aproximadamente 40 $\mu\text{g/L}$ el cual está muy por debajo de las concentraciones normales en el resto de los transectos, por tanto, es un valor anómalo de este transecto pero no de la ría en su conjunto

NITRATOS

El histograma de frecuencias de los *nitratos* está formado por clases de 125 $\mu\text{g/L}$ NO_3^- . La clase-0 incluye los primeros 9 $\mu\text{g/L}$ (4 casos), y la clase-10 aquellas observaciones superiores a 1125 $\mu\text{g/L}$ (1 caso). El histograma muestra como el 53% de las observaciones presentan concentraciones inferiores a 375 $\mu\text{g/L}$, el 70% presentan menos de 500 $\mu\text{g/L}$, y el 95% presentan menos de 750 $\mu\text{g/L}$ de NO_3^- .

Con relación a los diagramas de datos ordenados, los *nitratos* presentan una distribución simétrica definida por una evolución lineal de los resultados. En la zona superior de la distribución vemos como la pendiente se eleva rápidamente por causa de un número muy pequeño de observaciones identificados en los diagramas de box-whiskers a un valor anómalo en H4 y en varias observaciones dentro del rango válido de concentraciones de los transectos H1 y H4.

Los diagramas de box-whiskers de este parámetro muestran además, la existencia de dos tipos de comportamiento: un **descenso de las concentraciones de nitratos a medida que las estaciones se localizan hacia la desembocadura** y un **aumento considerable en el transecto H4**, incluyendo éste último un valor anómalo correspondiente a una concentración de 1,160 mg/L NO_3^- . Notar las altas concentraciones en este transecto. La explicación se resume en el parámetro *nitrógeno* que se comenta a continuación.

NITRÓGENO

Mediante este parámetro se resume el contenido de nitrógeno disuelto en la Ría de Huelva. Un ejercicio práctico que permite visionar el comportamiento de estas especies en un sistema acuático es calcular el porcentaje de aportación de cada una de las especies de N sobre el contenido total. Para la Ría de Huelva, estos porcentajes son los siguientes:

| Datos | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | Int. | Ría Huelva |
|------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------|
| Promedio de N-NH_4 (mg/L) | 0,051 | 0,051 | 0,018 | 0,014 | 0,088 | 0,181 | 0,038 |
| Promedio de N-NO_2 (mg/L) | 0,029 | 0,022 | 0,009 | 0,004 | 0,035 | 0,065 | 0,016 |
| Promedio de N-NO_3 (mg/L) | 0,090 | 0,074 | 0,049 | 0,087 | 0,117 | 0,128 | 0,083 |
| ΣN (mg/L) | 0,170 | 0,148 | 0,076 | 0,105 | 0,240 | 0,169 | 0,137 |
| % N-NH_4 | 30,0 | 34,8 | 23,4 | 13,3 | 36,58 | 48,3 | 27,7 |
| % N-NO_2 | 17,1 | 15,0 | 12,0 | 4,1 | 14,70 | 17,5 | 11,7 |
| % N-NO_3 | 52,9 | 50,2 | 64,6 | 82,6 | 48,73 | 34,2 | 60,6 |
| % ΣN | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |

En el medio marino en sistemas abiertos, la especie predominante es el nitrato presentando generalmente más de un 75% de contribución al contenido de N disuelto total. Este porcentaje es lógico si pensamos que es la especie de nitrógeno más estable, y que cualquier aporte en forma de amonio y nitrito al medio acuático se traducirá en un breve intervalo de tiempo en un aumento en el contenido de nitratos por oxidación química de

los anteriores. El control de amonio y nitrito es importante puesto que nos permite visualizar eventos o fuentes de contaminación de aguas residuales urbanas. Las aguas residuales brutas presentan altos niveles de amonio, bajos-medios de nitritos y muy bajos de nitratos. Si se produce un vertido reciente, en el medio acuático se encontrará un alto contenido de amonio. A medida que transcurre el tiempo, gran parte de este amonio se convertirá en nitritos y rápidamente en nitratos. Observando los porcentajes de cada especie sobre el contenido total vemos que el **porcentaje de amonio es muy importante en las estaciones interiores y en H1 y H2**, y disminuye progresivamente en los transectos hacia la desembocadura. El transecto H5, el cual sería característico de la evolución del parámetro a lo largo de la ría, muestra el segundo porcentaje más importante, valor que está muy influenciado por los transectos H1 y H2 y las estaciones localizadas en los ríos Tinto y Odiel. A medida que disminuye el porcentaje de amonio, aumenta el de nitratos. Los nitritos se mantienen sobre el 15 por ciento en los tres primeros transectos y disminuye considerablemente en el H4.

El histograma de frecuencias para la representación de *nitrógeno* se ha construido a partir de 66 casos clasificados en 10 clases de intervalos de 50 $\mu\text{g/L}$ N cada una. El histograma de frecuencias muestra una cierta concentración de valores en las clases 2 a 6 las cuales representan 60 de los 66 casos incluidos en la representación. En términos de porcentajes tenemos que el 50% de los resultados se centra en concentraciones intermedias a las que definen las clases 3 y 4 (100 $\mu\text{g/L}$ con un 38% y 150 $\mu\text{g/L}$ con un 64%). El 77% de los resultados se incluyen dentro de los primeros 200 $\mu\text{g/L}$, y el 95% se sitúan en los primeros 300 $\mu\text{g/L}$.

Con relación a la representación de datos ordenados vemos que existe una distribución aproximadamente simétrica, con forma ligeramente cóncava provocada por la aparición de algunas altas concentraciones por encima de 250 $\mu\text{g/L}$.

Los diagramas de box-whiskers de este parámetro muestran un **descenso progresivo de la concentración de N a lo largo de toda la ría con un aumento en el transecto H4**. La forma de la distribución es similar a la de los nitratos. Si bien el porcentaje de nitratos es inferior con respecto a otros sistemas acuáticos, presentan los mayores porcentajes por tanto, es lógico que el parámetro nitrógeno definido como la suma de las tres especies, presente la misma distribución que nitratos.

FOSFATOS

El histograma de frecuencia del parámetro *fosfatos* se ha construido a partir de un total de 66 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 75 $\mu\text{g/L}$ PO_4^{3-} . Para este parámetro no se han obtenido valores no detectados. En los primeros 37 casos se concentran los valores inferiores a 150 $\mu\text{g/L}$ (56%) y en 61 casos se concentran los valores por debajo de 375 $\mu\text{g/L}$. El 95% de las concentraciones de fosfatos medidas en la Ría de Huelva no superan los 525 $\mu\text{g/L}$ PO_4^{3-} .

El diagrama de datos ordenados muestra una distribución prácticamente simétrica con una cierta tendencia cóncava producida por las altas concentraciones medidas en las estaciones más interiores.

Los diagramas de box-whiskers muestran claramente una tendencia espacial de este parámetro, esto es, altas concentraciones en aguas interiores influenciadas por grandes polígonos industriales y zonas urbanas, y un **descenso progresivo a medida que los transectos se localizan hacia la desembocadura** y por tanto existe una mayor mezcla con el agua de mar procedente del Golfo de Cádiz.

FÓSFORO

El histograma de frecuencia del parámetro *fósforo total* se ha construido a partir de un total de 66 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 100 $\mu\text{g/L}$ P. Para este parámetro no se han obtenido valores no detectados. El 47% de los valores se resumen en los primeros 31 primeros casos, esto es, por debajo de los 200 $\mu\text{g/L}$. Por debajo de 400 $\mu\text{g/L}$ se concentra el 79 % de los casos y

por debajo de 700 $\mu\text{g/L}$ se incluye el 94%. La distribución del histograma indica que un alto porcentaje de valores se encuadra entre los 200 y los 300 $\mu\text{g/L}$.

El diagrama de datos ordenados muestra que hasta aproximadamente los 300 $\mu\text{g/L}$ la tendencia es lineal indicando una variación progresiva de los resultados. A partir de estos valores, cambia la pendiente de la curva para darle una forma cóncava indicando un aumento elevado en el contenido de P de algunas observaciones. La forma de esta curva es similar a la obtenida para el nitrógeno, y curiosamente, la **variación espacial** y la forma de la distribución del diagrama de box-whisker también es similar al obtenido para el nitrógeno, esto es, altas concentraciones en las estaciones interiores y H1 y descenso progresivo en H2 y H3 con un aumento considerable en H4.

Es posible que las **altas concentraciones de nitrógeno y fósforo en H4** tengan el mismo origen. Se apunta la posibilidad de la **presencia de vertidos de aguas residuales** en H4 procedentes del núcleo urbano de Mazagón.

SILICATOS

El histograma de frecuencia del parámetro *silicatos* se ha construido a partir de un total de 54 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 75 $\mu\text{g/L Si}$. La primera clase está formada por el número de observaciones en las cuales no se ha detectado este parámetro (8 casos, 15% de las observaciones). El límite de detección se ha establecido en 11 $\mu\text{g/L Si}$. El histograma de silicatos muestra una gran concentración de observaciones en las tres primeras clases correspondientes a los primeros 150 $\mu\text{g/L}$. La clase 2 recoge el 56 % de las observaciones (75 $\mu\text{g/L Si}$) y la 3 el 81 % (150 $\mu\text{g/L Si}$). El 94 % de las observaciones presentan valores inferiores a 375 $\mu\text{g/L Si}$. El resto del histograma está muy influenciado por la presencia de algunos valores muy altos como así se muestra también en el diagrama de datos ordenados. Estos **valores altos** se localizan en las **estaciones interiores** como así lo muestra el diagrama de box-whisker. En éste vemos la existencia de una gran diferencia entre estas estaciones y el resto de transectos. Curiosamente, se vuelve a dar la misma situación que con *nitrógeno* y *fósforo*, es decir, se produce un aumento en el transecto H4. El transecto H1 presenta un valor anómalo superior, sin embargo es inferior a los valores obtenidos en las estaciones interiores.

SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN

El límite de detección de este parámetro se ha fijado en 1 mg/L , cantidad que constituye la primera clase del histograma. Para este parámetro volvemos a tener 66 casos divididos en diez clases de 25 mg/L cada una excepto la primera, la cual no presenta ningún caso no detectado. Tanto en el histograma de frecuencias como en el diagrama de datos ordenados se observa la existencia de dos grupos de valores, un grupo que se corresponde con un conjunto de valores bajos inferiores a 50 mg/L (69%), y un grupo de valores altos entre 150 a 200 mg/L (97% total).

En el diagrama de box-whisker se observa que exceptuando los valores calculados como anómalos o extremos, los **valores altos de sólidos en suspensión se centran en las estaciones internas correspondientes a los ríos Tinto y Odiel**. Las estaciones situadas en los transectos H1 y H2 presentan valores intermedios perteneciendo a los dos grupos de valores, y las estaciones exteriores H3 y H4 sólo pertenecen al grupo de valores bajos.

COT

Para este parámetro se han establecido clases de 2 mg/L C exceptuando la primera de 1 mg/L que representa el límite de detección. Este parámetro presenta dos grupos de medidas, un grupo formado por bajas concentraciones de carbono en torno a los 6 mg/L (67% de los casos) y un grupo de altas concentraciones de carbono alrededor de 14 mg/L (92% en total). En el diagrama box-whisker se observa como el primer grupo está formado por la gran mayoría de las determinaciones realizadas en todos los

transectos. El segundo grupo está formado en su mayoría por valores extremos medidos en los transectos H2, H3 y H4 mas algunas mediciones realizadas en H1.

COBRE

El histograma de frecuencia del parámetro *cobre* se ha construido a partir de un total de 66 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 10 µg/L Cu.

Tanto en el histograma de frecuencias como en el de datos ordenados se observa una distribución muy simétrica de los resultados con sólo un par de observaciones que distorsionan esta asimetría perteneciente a las estaciones interiores. Un 55% de las observaciones se incluyen en los 30 primeros µg/L, y el 95% es inferior a 70 µg/L.

El diagrama de box-whisker muestra como existe una gran **variabilidad espacial** a lo largo de toda la ría, esto es, existen altas concentraciones en las estaciones interiores próximas a los núcleos antropizados, **disminuyendo progresivamente cuando las estaciones se localizan hacia la desembocadura.**

PLOMO

El histograma de frecuencia del parámetro *plomo* se ha construido a partir de un total de 66 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 3 µg/L Pb. El límite de detección es de 1 µg/L no obteniéndose ningún valor no detectado. El 71% de los casos se concentran en los 8 µg/L y el 94% inferior a 13 µg/L.

La forma del histograma así como la del diagrama de datos ordenados muestran una variación simétrica afectado exclusivamente por varios casos que presentan altas concentraciones de plomo. En especial existe un valor muy alto que se identifica como un valor anómalo en el transecto H2. En este diagrama también se observa la **tendencia espacial** de este parámetro **disminuyendo a medida que se localizan los datos hacia la desembocadura.** El valor anómalo se produce en el transecto H2. No hay que olvidar que este transecto se localiza en un importante polo industrial de Huelva.

CADMIO

El histograma de frecuencia del parámetro *cadmio* se ha construido a partir de un total de 66 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 0,5 µg/L Cd con una clase inicial de 0,1 µg/L representando las observaciones no detectadas que en este caso han sido de 2 (3%). El 52 % de los valores se concentran en las tres primeras clases (1 µg/L), el 76% presentan menos de 2 µg/L y el 94% presentan menos de 4 µg/L Cd.

El diagrama de datos ordenados presenta una evolución aproximadamente simétrica con una cierta concavidad producida por los valores altos medidos en aguas interiores.

El diagrama de box-whisker muestra claramente la existencia de una **tendencia espacial** de este metal, estando localizada la fuente en las estaciones interiores o previas a éstas.

ZINC

El histograma para el *zinc* se ha construido a partir de un total de 66 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 75 µg/L Zn con una clase inicial de 3 µg/L representando las observaciones no detectadas que en este caso no se han obtenido. El 58% de los casos se concentra en la segunda clase de 75 µg/L, con la tercera se concentran el 80% de los casos (150 µg/L), y el 95% de los resultados se encuentran por debajo de los 375 µg/L.

El diagrama de datos ordenados muestra un figura cóncava de la curva localizándose los valores superiores en las estaciones interiores. También para este parámetro existe una **tendencia espacial** marcada en la ría.

4.1.4. MATRIZ DE CORRELACIÓN. ANÁLISIS CLUSTER. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.

Mediante el paquete informático Statistica 6.0 (StatSoft Inc. 1997) se ha computado la matriz de correlación de las variables estudiadas en la Ría de Huelva además de un análisis cluster y el análisis de componentes principales y análisis factorial de las variables.

Además, se ha realizado el cluster de las estaciones de muestreo con objeto de clasificar las estaciones de muestreo en función de la calidad de las aguas.

4.1.4.1. MATRIZ DE CORRELACIÓN

Se ha realizado la *matriz de correlación de Pearson* de todas las variables físico-químicas estudiadas en la Ría de Huelva. Para esta área ambiental el número de casos computados ha sido N=53. La siguiente tabla muestra los coeficientes de determinación de las variables para este número de casos. Con objeto de visualizar mejor el signo en las correlaciones, se ha representado en color azul oscuro las correlaciones positivas y en color rojo oscuro las correlaciones negativas.

Asimismo, puesto que para el análisis de estas matrices es necesario comprobar las representaciones de la dispersión de cada par de variables, se han incluido las representaciones de éstas.

Tabla C II.29. Matriz de correlaciones de las variables en la Ría de Huelva

| | pH | T | S | NH ₄ | NO ₂ | NO ₃ | SN | PO ₄ | P | Si | SS | SV | TC | IC | COT | Cu | Pb | Cd | Zn | SMe | |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|--|
| pH | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| T | 0,01 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S | 0,49 | -0,67 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NH ₄ | -0,29 | 0,54 | -0,37 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NO ₂ | -0,37 | 0,37 | -0,43 | 0,80 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NO ₃ | -0,29 | 0,63 | -0,49 | 0,35 | 0,18 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| SN | -0,38 | 0,70 | -0,54 | 0,84 | 0,69 | 0,79 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | |
| PO ₄ | -0,75 | -0,17 | -0,18 | 0,44 | 0,58 | 0,14 | 0,41 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | |
| P | -0,18 | 0,41 | -0,22 | 0,72 | 0,77 | 0,36 | 0,71 | 0,53 | 1,00 | | | | | | | | | | | | |
| Si | -0,48 | -0,28 | -0,10 | -0,03 | 0,09 | 0,06 | 0,03 | 0,57 | 0,09 | 1,00 | | | | | | | | | | | |
| SS | -0,09 | 0,43 | -0,47 | 0,41 | 0,72 | 0,08 | 0,39 | 0,12 | 0,47 | 0,02 | 1,00 | | | | | | | | | | |
| SV | 0,02 | 0,33 | -0,35 | 0,36 | 0,63 | -0,02 | 0,28 | 0,07 | 0,45 | -0,01 | 0,93 | 1,00 | | | | | | | | | |
| TC | 0,21 | -0,53 | 0,45 | -0,27 | -0,12 | -0,41 | -0,40 | -0,08 | -0,14 | -0,26 | -0,10 | -0,04 | 1,00 | | | | | | | | |
| IC | 0,20 | 0,44 | -0,31 | 0,13 | 0,20 | 0,17 | 0,20 | -0,34 | 0,17 | -0,43 | 0,41 | 0,38 | 0,43 | 1,00 | | | | | | | |
| COT | 0,14 | -0,79 | 0,65 | -0,36 | -0,22 | -0,54 | -0,53 | 0,07 | -0,23 | -0,09 | -0,30 | -0,22 | 0,91 | 0,02 | 1,00 | | | | | | |
| Cu | -0,61 | -0,29 | 0,01 | 0,25 | 0,18 | 0,13 | 0,23 | 0,75 | 0,19 | 0,54 | -0,28 | -0,30 | 0,03 | -0,35 | 0,20 | 1,00 | | | | | |
| Pb | -0,35 | -0,18 | 0,00 | 0,48 | 0,56 | -0,10 | 0,29 | 0,60 | 0,43 | 0,03 | 0,13 | 0,13 | 0,43 | 0,15 | 0,41 | 0,60 | 1,00 | | | | |
| Cd | -0,65 | -0,20 | -0,07 | 0,23 | 0,19 | 0,21 | 0,27 | 0,80 | 0,27 | 0,62 | -0,26 | -0,31 | -0,16 | -0,50 | 0,05 | 0,85 | 0,38 | 1,00 | | | |
| Zn | -0,56 | -0,60 | 0,18 | -0,14 | -0,10 | -0,05 | -0,12 | 0,66 | -0,06 | 0,79 | -0,39 | -0,38 | 0,02 | -0,56 | 0,29 | 0,81 | 0,26 | 0,80 | 1,00 | | |
| SMe | -0,58 | -0,57 | 0,16 | -0,09 | -0,05 | -0,03 | -0,07 | 0,69 | -0,02 | 0,77 | -0,38 | -0,38 | 0,03 | -0,54 | 0,29 | 0,86 | 0,32 | 0,83 | 1,00 | 1,00 | |

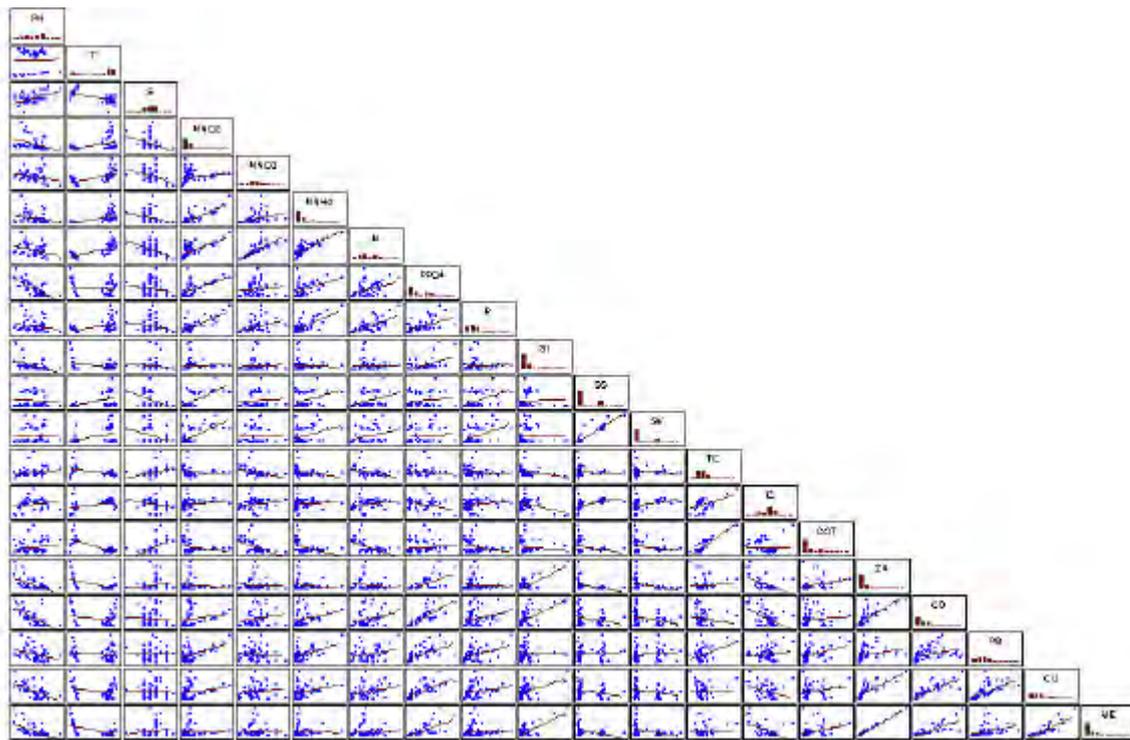


Figura C II.4. Matriz de diagramas de dispersión de las variables de estudio en la Ría de Huelva

La matriz de correlación resultante muestra como existe un **gran número de correlaciones significativas entre las variables de estudio**. El gran número de casos hace que muchos de estos coeficientes sean pequeños aunque significativos con una $p < 0,05$.

Entre las correlaciones positivas cabe destacar las siguientes:

Nutrientes: vemos cómo existe un grupo de parámetros relativos a formas de nitrógeno, fósforo y sílice que presentan correlaciones positivas entre sí:

- El amonio se correlaciona positivamente con los nitritos, nitratos, fosfatos y fósforo total (es especialmente significativa la correlación con nitritos y fósforo total).
- Los nitritos además se correlacionan con los fosfatos y el fósforo total siendo esta última muy significativa.
- Los nitratos se correlacionan con el fósforo total.
- Los silicatos se correlacionan con los fosfatos y no presenta ninguna otra correlación con nutrientes.

Metales: existen correlaciones positivas significativas entre los metales entre sí. De éstas cabe destacar las siguientes:

- Cobre con plomo, cadmio y zinc.
- Plomo y cadmio.
- Cadmio y zinc.

Los metales pesados también se correlacionan positivamente con algunos de los nutrientes:

- Fosfatos con los cuatro metales y una alta significancia.
- Silicatos con cobre, cadmio y zinc.

Otros parámetros: otras correlaciones positivas muy significativas son las siguientes:

- Sólidos en suspensión y sólidos volátiles.

Entre las correlaciones negativas cabe destacar las siguientes:

Nutrientes: la gran mayoría de los nutrientes se correlacionan negativamente con el pH y la salinidad.

Metales: correlación negativa entre metales y pH.

Considerando que en los vertidos de aguas residuales existe un gran contenido de nutrientes, y que el pH y la salinidad de estos vertidos debe ser menor que los medidos en agua de mar, se puede decir que la calidad de **las aguas de la Ría de Huelva está muy influenciada por los vertidos que recibe**. La alta correlación positiva del amonio con otros nutrientes puede indicar contaminación reciente de aguas residuales urbanas. La disminución de nutrientes con el aumento de pH y salinidad indican dilución de los vertidos en las aguas receptoras.

En relación a los metales pesados, vemos como aumenta el contenido en éstos cuando disminuye el pH. El origen de esta correlación puede deberse a dos factores, la dilución de los vertidos y por tanto la disminución de la concentración de metales en agua, y la mayor disponibilidad de los metales pesados al disminuir el pH. En principio, las variaciones de pH no son muy grandes por lo que es lógico pensar que se debe fundamentalmente a procesos de dilución en la ría.

Por último, dentro de este apartado, se puede concluir que la **matriz de correlación explica fenómenos de contaminación-dilución de vertidos en la Ría de Huelva**. Si bien, el comportamiento de ciertos parámetros en los procesos de dilución pueden sospecharse, con el uso de las matrices de correlaciones se obtiene un soporte estadístico que permite confirmar y explicar estos procesos. Estas conclusiones se

complementan con las obtenidas con los diagramas de box-whiskers fundamentalmente en lo referente a la variabilidad espacial de algunos parámetros a lo largo de la ría.

4.1.4.2. ANÁLISIS CLUSTER DE LA RÍA DE HUELVA

En relación con el *análisis cluster* en la Ría de Huelva, se han representado dos tipos de cluster:

- i. *Cluster de variables*, en el cual se realiza una clasificación de las variables de estudio. Se incluyen dos dendogramas, el primero en el cual se incluyen todas las variables (17 variables fisicoquímicas y 53 casos computados), y un segundo dendograma en el cual sólo se incluyen variables relativas a nutrientes (7 variables fisicoquímicas y 53 casos computados).
- ii. *Cluster de casos*, en el cual se realiza una clasificación de las estaciones de muestreo según la similitud de la composición de sus aguas (17 variables fisicoquímicas 18 estaciones de muestreo). También se incluyen dos dendogramas diferentes: el primero computado con 17 variables fisicoquímicas, y un segundo dendograma computados sólo con las variables relativas a nutrientes.

Las 17 variables fisicoquímicas fueron: pH, temperatura, salinidad, nitritos, nitratos, amonio, fosfatos, fósforo total, silicatos, carbono total disuelto, carbono orgánico disuelto, sólidos en suspensión, sólidos volátiles, cadmio, plomo, cobre y zinc.

Las 7 variables relativas a nutrientes son: nitritos, nitratos, amonio, fosfatos, fósforo total, silicatos y carbono total disuelto.

Estos análisis se han realizado a partir de los valores estandarizados de las variables transformadas logarítmicamente ($\log(x+1)$, siendo x el valor de la variable), utilizando como distancias métricas las distancias euclídeas, y como regla de amalgamación el método descrito por Ward siguiendo las recomendaciones de diversos autores (ver apartado de introducción a estos análisis en el presente capítulo).

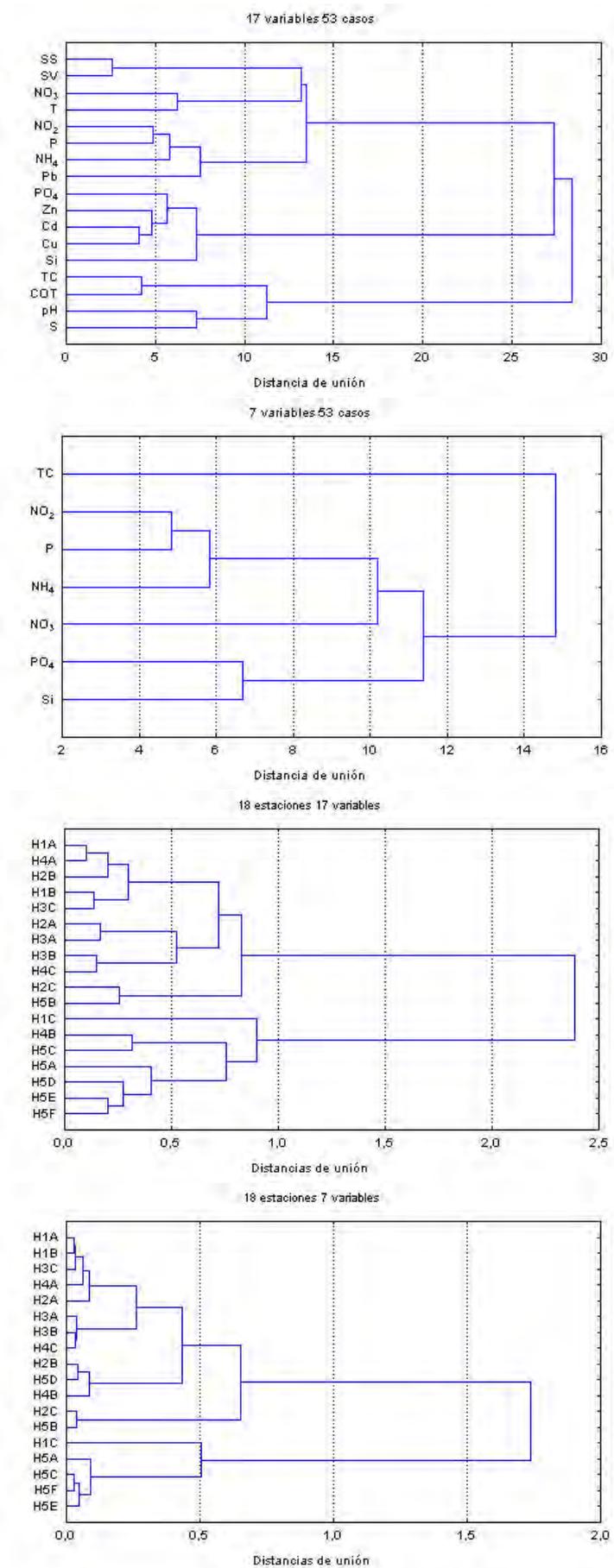


Figura C II.5. Dendrogramas obtenidos del análisis cluster en la Ría de Huelva

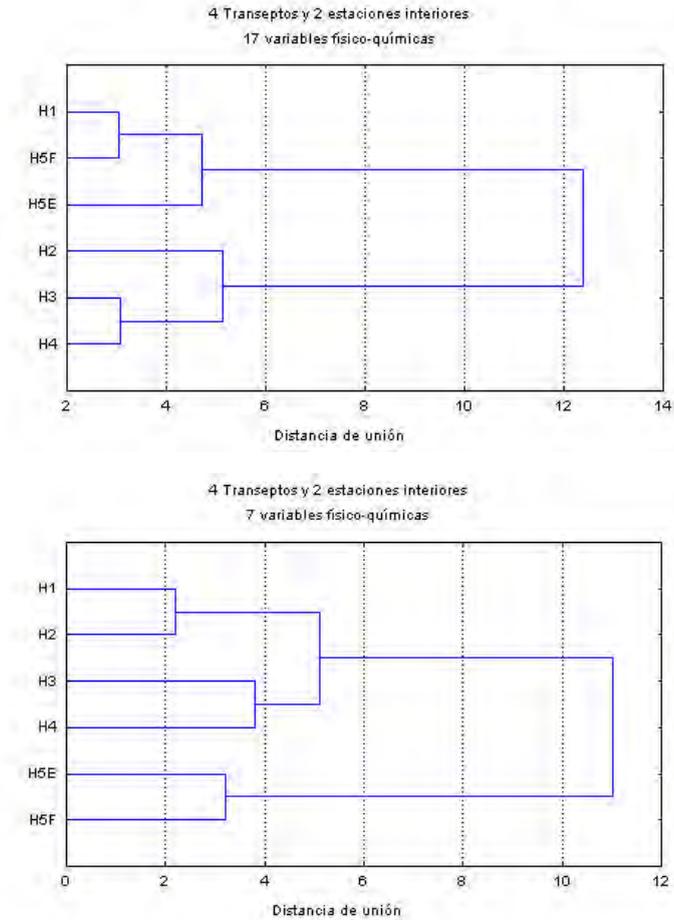


Figura C II.5. Dendrogramas obtenidos del análisis cluster en la Ría de Huelva (cont.)

Los dendrogramas de variables aportan conclusiones similares a las obtenidas con las matrices de correlación.

Dendrograma de 17 variables.

Las primeras asociaciones que se producen son las siguientes:

- Este dendrograma vuelve a dar similitudes entre pH y S.
- Fosfatos, cadmio, zinc, cobre y sílice forman otro de los grupos de variables que presentan una gran similitud.
- Otros grupo es el de nitritos, amonio, fosfatos y plomo.
- Carbono total y carbono orgánico forma un grupo.
- En otro grupo más aislado se encuentran los sólidos en suspensión y los sólidos volátiles.

A partir de estas primeras asociaciones, se forman tres grupos diferentes de parámetros en unas segundas asociaciones:

- Primer grupo: sólidos en suspensión y volátiles; nitratos y temperatura; nitritos, fósforo, amonio y plomo.
- Segundo grupo: fosfatos, zinc, cadmio y cobre; silicatos.
- Tercer grupo: carbono total y orgánico, pH y salinidad.

Dendograma de 7 variables.

Las asociaciones que se producen son las siguientes:

- Nitritos, fósforo y amonio.
- Fosfatos y silicatos.

Este grupo se une posteriormente con nitratos, y finalmente el carbono total es el que presenta menos similitud con el resto de parámetros.

Dendograma de estaciones y transectos

En los dendogramas de estaciones y en los de transectos, las agrupaciones se realizan por similitud en la composición del agua.

Debido al gran número de estaciones que hay seleccionadas a lo largo de la Ría de Huelva, las asociaciones que se forman tanto para 7 como para 17 variables a veces pueden parecer no claras o que no formen grupos de estaciones de calidad de agua parecidas. A veces esto es debido a que a pesar de que tres estaciones de muestreo formen un transecto transversal, y a priori se pueda pensar que la calidad de las aguas en estas tres estaciones debe ser muy parecida, la composición de cada una de ellas o de una de ellas en concreto puede verse alterada por localizarse en las proximidades de algún pantalán, desagüe de vertido, etc. Por ejemplo, se ha comprobado que en el transecto H2, la estación situada en la orilla derecha H2A presenta peor calidad que las estaciones H2B y H2C debido a que se localiza dentro del muelle industrial *Reina Sofía* del polígono industrial de Palos de la Frontera.

En los diagramas de box-whisker se observó la gran variabilidad espacial de los parámetros cuando se trabaja únicamente con transectos. Por ello, y aunque se observan asociaciones claras en los dendogramas, es mucho más interesante observar los resultados obtenidos, cuando se computa la calidad global del transecto, es decir, se opera con valores promedios. En las representaciones realizadas con transectos, se han incluido además los resultados obtenidos en estaciones individuales de especial interés, en este caso las correspondientes a los ríos Tinto y Odiel.

El dendograma de 7 variables, se observan tres zonas claramente diferenciadas:

- Estaciones interiores.
- Transectos H1 y H2, es decir, transectos interiores.
- Transectos H3 y H4 o transectos exteriores.

En una segunda asociación, se agrupan los transectos de la ría para diferenciarse claramente de las estaciones interiores.

El dendograma de 17 variables cambia los grupos obtenidos anteriormente. En estos diagramas se han incluido los contenidos en metales pesados en las aguas.

- El transecto H1 y las estaciones H5F y H5E se unen en un primer grupo. H1 y H5F (río Tinto) muestran entre sí mayor similitud.
- El transecto H2, H3 y H4 forman un segundo grupo, y previamente H3 y H4 forman una unión.

En conclusión, se corroboran y complementan las conclusiones obtenidas en los diagramas de box-whisker. **Existe una variabilidad espacial en la Ría de Huelva, con aguas de peor calidad en aguas situadas en las posiciones más interiores y aguas de mejor calidad a medida que se sale del ecosistema.** Puede realizarse una zonificación clara de la misma siendo más clara espacialmente, la descrita para los transectos y 7 variables físico-químicas.

4.1.4.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LA RÍA DE HUELVA

En el análisis de las matrices de correlación se han obtenido gran número de correlaciones significativas entre las variables de estudio. Las correlaciones que se obtienen en este apartado explica relaciones lineales entre variables agrupadas de dos en dos. Para obtener una visión de las relaciones no-lineales o de relaciones que puedan estar enmascaradas, se suelen utilizar otras herramientas de cálculo complementarias como son las técnicas de *análisis de componentes principales* (PCA) y el *análisis factorial* (FA)(ver apartado de introducción a estos análisis en el presente capítulo).

Al igual que para el análisis cluster, para la realización del PCA/FA se ha operado con las variables transformadas logarítmicamente y estandarizadas. Tras un análisis previo de componentes principales se ha realizado una rotación varimax de los factores iniciales.

Se ha realizado el análisis factorial de variables físico químicas incluyendo a su vez dos análisis: un análisis de todo el conjunto de variables físico-químicas (20 variables en total) y un análisis de aquellas variables referentes a nutrientes mayoritarios (C, N, P y Si, 10 variables en total).

Las 20 variables fisicoquímicas fueron: pH, temperatura, salinidad, nitritos, nitratos, amonio, nitrógeno disuelto, fosfatos, fósforo total, silicatos, carbono total disuelto, carbono inorgánico, carbono orgánico disuelto, sólidos en suspensión, sólidos volátiles, cadmio, plomo, cobre, zinc y contenido total e metales analizados.

Las 7 variables relativas a nutrientes son: nitritos, nitratos, amonio, fosfatos, fósforo total, silicatos y carbono total disuelto.

Las siguientes tablas muestran el número de autovalores/autovectores obtenidos en cada uno de estos análisis así como la varianza explicada por cada uno de los factores, y la varianza total explicada. El número total de autovalores/autovectores utilizados en el PCA/FA se ha seleccionado siguiendo el criterio de algunos autores los cuales consideran todos aquellos autovalores/autovectores de valor mayor a 1.

Así pues, para 20 variables vemos que se obtienen 4 autovalores los cuales explican el 84,9% de la varianza total. En el análisis de 10 variables se obtienen 3 autovalores los cuales explican el 83,0% de la varianza total. Estos porcentajes son bastante altos y por tanto, este análisis explica bastante bien la varianza del conjunto de datos en la Ría de Huelva.

ANÁLISIS FACTORIAL DE 20 VARIABLES

En PCA/FA de 20 variables se obtienen 4 autovalores los cuales explican el 84,5% de la varianza total de la muestra. La tabla siguiente muestra estos valores:

Tabla C II.30. Análisis factorial para 17 variables

| Factor | Autovalores | % Varianza total | Autovalores acumulados | % Varianza acumulada |
|--------|-------------|------------------|------------------------|----------------------|
| 1 | 6.415 | 32.077 | 6.415 | 32.077 |
| 2 | 6.203 | 31.014 | 12.618 | 63.091 |
| 3 | 2.864 | 14.320 | 15.482 | 77.411 |
| 4 | 1.408 | 7.041 | 16.890 | 84.452 |

Tabla C II.31. Factores obtenidos para 17 variables

| | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Factor 4 |
|--------------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| Sólidos Suspensión | -0.256 | 0.276 | 0.151 | 0.876 |
| Sólidos volátiles | -0.230 | 0.247 | 0.022 | 0.896 |
| Carbono total | -0.156 | -0.059 | -0.903 | -0.027 |
| Carbono inorgánico | -0.536 | 0.159 | -0.067 | 0.258 |
| Carbono orgánico | 0.132 | -0.103 | -0.934 | -0.109 |
| Nitritos | 0.165 | 0.739 | 0.046 | 0.586 |
| Nitratos | 0.069 | 0.379 | 0.675 | -0.191 |
| Amonio | 0.052 | 0.880 | 0.233 | 0.180 |
| Nitrógeno disuelto | 0.095 | 0.773 | 0.526 | 0.084 |
| Fosfatos | 0.820 | 0.473 | -0.053 | 0.155 |
| Fósforo | 0.100 | 0.830 | 0.111 | 0.300 |
| Silicatos | 0.798 | -0.141 | 0.201 | 0.258 |
| PH | -0.785 | -0.131 | -0.240 | -0.124 |
| Temperatura | -0.435 | 0.407 | 0.704 | 0.166 |
| Salinidad | -0.113 | -0.106 | -0.646 | -0.412 |
| Zinc | 0.930 | -0.108 | -0.155 | -0.224 |
| Cadmio | 0.869 | 0.269 | 0.086 | -0.239 |
| Plomo | 0.382 | 0.592 | -0.520 | 0.108 |
| Cobre | 0.848 | 0.295 | -0.107 | -0.250 |
| S Metales | 0.940 | -0.033 | -0.164 | -0.230 |
| Expl.Var | 5.997 | 3.888 | 3.870 | 2.699 |
| Prp.Totl | 0.300 | 0.194 | 0.194 | 0.135 |

De los cinco autovalores obtenidos se comprueba como los dos primeros son de gran importancia contribuyendo entre ambos al 63,1% de la varianza total del conjunto de datos de estas variables.

Este primer factor está formado por un grupo de variables las cuales ya se identificaron en el análisis cluster de 17 variables. En el cluster encontrábamos agrupados a los parámetros fosfatos, silicatos, zinc, cadmio, cobre y pH. Aquí aparece el pH con signo negativo y por tanto se elimina del grupo. Este **primer factor** representa la **contaminación por metales en la Ría de Huelva** quedándose patente en el alto valor del coeficiente del parámetro que se ha definido como la suma del contenido de metales.

El segundo factor está formado por los parámetros nitritos, amonio, nitrógeno disuelto y fósforo total. El cluster de 17 variables identificó la similitud de nitritos y amonio junto con el fósforo y junto con el plomo. En este PCA/FA el plomo no se incluye en el grupo al nivel de significancia seleccionado pero se observa al alto valor del coeficiente. Observando la naturaleza y el posible origen de estos parámetros puede concluirse que el **segundo factor** representa la **contaminación por vertidos de aguas residuales ricos en nutrientes en la Ría de Huelva**.

El tercer factor está formado por tres variables, carbono total, carbono orgánico y temperatura. Carbono total y carbono orgánico parecen con un alto valor del coeficiente pero con signo negativo. La temperatura presenta un alto coeficiente pero de signo positivo. Este **tercer factor** representa por tanto, el contenido de carbono de la ría lo que puede interpretarse como la **contaminación de tipo orgánica**. La relación con la temperatura puede indicar una estacionalidad de estos parámetros relacionados con procesos degradativos, pero la interpretación no es clara.

El cuarto factor explica un pequeño porcentaje a la varianza total pero cabe reseñarlo puesto que aparece agrupado en los diferentes análisis cluster realizados, no sólo en la Ría de Huelva, sino también en el resto de las áreas ambientales estudiadas. Este **cuarto factor** representa el **contenido de sólidos** en suspensión de la ría: sólidos en suspensión totales y volátiles.

Una vez visto los factores (número e importancia de cada uno) y los parámetros que forman los mismos se puede concluir que **en la Ría de Huelva existen dos fenómenos de contaminación bien identificados: contaminación por metales pesados y contaminación por vertidos de aguas residuales. De ambos fenómenos, el primero es el que aparece como más importante.**

ANÁLISIS FACTORIAL DE 10 VARIABLES

Puesto que el capítulo de caracterización físico-química de las zonas de estudio se ha centrado fundamentalmente en el estudio de los nutrientes, se ha realizado un PCA/FA de estos parámetros con objeto de obtener conclusiones adicionales.

En PCA/FA de 10 variables se obtienen 3 autovalores los cuales explican el 81,9% de la varianza total de la muestra. La tabla siguiente muestra estos valores:

Tabla C II.32. Análisis factorial para 7 variables

| Factor | Autovalores | % Varianza total | Autovalores acumulados | % Varianza acumulado |
|--------|-------------|------------------|------------------------|----------------------|
| 1 | 4.316 | 43.164 | 4.316 | 43.164 |
| 2 | 1.957 | 19.571 | 6.274 | 62.736 |
| 3 | 1.915 | 19.150 | 8.189 | 81.886 |

Tabla C II.33. Factores obtenidos para 10 variables

| | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 |
|--------------------|--------------|---------------|---------------|
| Carbono total | -0.034 | -0.889 | 0.363 |
| Carbono inorgánico | 0.242 | -0.081 | 0.837 |
| Carbono orgánico | -0.111 | -0.939 | -0.089 |
| Nitritos | 0.918 | -0.001 | -0.043 |
| Nitratos | 0.375 | 0.709 | 0.121 |
| Amonio | 0.854 | 0.263 | 0.057 |
| Nitrógeno disuelto | 0.794 | 0.550 | 0.092 |
| Fosfatos | 0.658 | -0.154 | -0.639 |
| Fósforo | 0.878 | 0.106 | -0.027 |
| Silicatos | 0.125 | 0.116 | -0.821 |
| Expl.Var | 3.635 | 2.601 | 1.952 |
| Prp.Totl | 0.363 | 0.260 | 0.195 |

El 36% de la varianza total de la muestra es explicada por el factor 1 el cual coincide en número de parámetros con el obtenido en el análisis de 20 variables. Los otros dos factores, excluyendo los valores negativos se quedan con nitratos en el factor 2 y carbono inorgánico en el factor 3.

El contenido de fosfatos en la ría sería incluido en el factor 1 sin embargo y aunque aparece con un coeficiente alto, para el nivel de significación seleccionado, no está incluido en la varianza explicada de este factor.

Así pues se puede concluir que los fenómenos de contaminación en la Ría de Huelva pueden explicarse en base a un conjunto de parámetros relativos al contenido de nutrientes en las aguas. Los parámetros que mejor lo explican son los incluidos en el factor 1.

4.2. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA BAHÍA DE CÁDIZ

4.2.1. RESULTADOS PROMEDIOS OBTENIDOS EN LAS ESTACIONES Y DE MUESTREO

Como ya se comentó en el apartado de descripción de las zonas de estudio, en la Bahía de Cádiz se dispusieron dos transectos en el saco exterior de la bahía (C1 y C2), un transecto en el tránsito entre el saco exterior y el interior (C3), y un transecto en el canal de entrada al puerto pesquero de Puerto Real (C4). Además se situaron tres estaciones denominadas interiores (C5A –río Guadalete–, C5E –factoría de La Carraca–, y C5F –Puente Zuazo–) que junto con tres estaciones más conforman un transecto paralelo a la morfología de la bahía (C5). Los resultados que se muestran a continuación son los resultados promedios de cuatro muestreos realizados en estaciones climatológicas extremas (invierno y verano) durante el periodo 1998-2000. La última columna representa los valores medios de cada transecto obtenidos como los promedios de las estaciones de muestreo que conforman el transecto en cuestión.

Tabla C II.34. Promedio de las variables físico-químicas. Transecto C1

| Parámetros \ Estaciones | C1A | C1B | C1C | C1D | C1 |
|---|------------------|------------------|------------------|----------------|------------------|
| pH | 8,08 | 8,13 | 8,11 | 8,10 | 8,11 |
| Desv.Est. | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 | 0,03 |
| Temperatura (°C) | 17,5 | 17,8 | 17,7 | 17,8 | 17,7 |
| Desv.Est. | 3,8 | 4,4 | 4,8 | 4,9 | 4,0 |
| Salinidad | 37,3 | 37,0 | 37,0 | 36,9 | 37,0 |
| Desv.Est. | 2,2 | 1,2 | 1,2 | 1,0 | 1,3 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,022 | 0,011 | 0,012 | 0,036 | 0,020 |
| Desv.Est. | 0,031 | 0,009 | 0,009 | 0,021 | 0,020 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,004 | 0,004 | 0,005 | 0,008 | 0,005 |
| Desv.Est. | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,009 | 0,005 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,056 | 0,068 | 0,045 | 0,065 | 0,059 |
| Desv.Est. | 0,040 | 0,069 | 0,034 | 0,063 | 0,049 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | <0,010 | <0,010 | <0,010 | 0,013 | <0,010 |
| Desv.Est. | --- | --- | --- | 0,003 | --- |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,111 | 0,054 | 0,058 | 0,049 | 0,068 |
| Desv.Est. | 0,137 | 0,035 | 0,033 | 0,021 | 0,071 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,102 | 0,109 | 0,125 | 0,111 | 0,112 |
| Desv.Est. | 0,088 | 0,062 | 0,071 | 0,098 | 0,070 |
| Carbono total (mg/L C) | 30,39 | 31,37 | 30,14 | 32,18 | 31,02 |
| Desv.Est. | 4,17 | 0,82 | 2,39 | 3,32 | 2,77 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 24,58 | 25,24 | 25,60 | 24,09 | 24,87 |
| Desv.Est. | 1,54 | 2,20 | 1,36 | 4,70 | 2,57 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 6,31 | 6,14 | 4,54 | 8,09 | 6,27 |
| Desv.Est. | 3,67 | 2,46 | 1,82 | 5,03 | 3,36 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 31,4 | 29,9 | 29,4 | 29,3 | 30,0 |
| Desv.Est. | 19,1 | 25,4 | 25,9 | 26,3 | 21,8 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 18,2 | 21,3 | 19,1 | 16,7 | 18,8 |
| Desv.Est. | 18,6 | 19,1 | 15,7 | 13,6 | 15,2 |
| Cobre (mg/L Cu) | 0,004 | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,003 |
| Desv.Est. | 0,001 | 0,000 | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Plomo (mg/L Pb) | 0,003 | <0,001 | <0,001 | 0,002 | 0,002 |
| Desv.Est. | 0,002 | -- | --- | 0,002 | 0,001 |
| Cadmio (mg/L Cd) | 0,00019 | 0,00019 | 0,00007 | 0,00058 | 0,00026 |
| Desv.Est. | 0,00017 | 0,00009 | 0,00003 | 0,00097 | 0,00022 |
| Zinc (mg/L Zn) | 0,015 | 0,006 | 0,005 | 0,006 | 0,008 |
| Desv.Est. | 0,011 | 0,003 | 0,002 | 0,002 | 0,007 |

Tabla C II.35. Promedio de las variables físico-químicas. Transecto C2

| Parámetros \ Estaciones | C2A | C2B | C2C | C2 |
|---|----------------|-------------------|-------------------|----------------|
| pH | 8,12 | 8,08 | 8,12 | 8,11 |
| Desv.Est. | 0,04 | 0,09 | 0,05 | 0,06 |
| Temperatura (°C) | 17,9 | 17,9 | 18,0 | 17,9 |
| Desv.Est. | 5,1 | 4,7 | 4,1 | 4,2 |
| Salinidad | 36,9 | 37,5 | 37,6 | 37,3 |
| Desv.Est. | 1,8 | 1,1 | 1,7 | 1,4 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,040 | 0,024 | 0,020 | 0,028 |
| Desv.Est. | 0,048 | 0,021 | 0,022 | 0,031 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,004 | 0,006 | 0,004 | 0,004 |
| Desv.Est. | 0,002 | 0,005 | 0,003 | 0,003 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,056 | 0,046 | 0,162 | 0,088 |
| Desv.Est. | 0,059 | 0,036 | 0,218 | 0,131 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | 0,011 | < 0,010 | < 0,010 | 0,008 |
| Desv.Est. | 0,004 | --- | --- | 0,004 |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,063 | 0,079 | 0,037 | 0,059 |
| Desv.Est. | 0,020 | 0,032 | 0,017 | 0,028 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,176 | 0,119 | 0,114 | 0,136 |
| Desv.Est. | 0,063 | 0,064 | 0,090 | 0,070 |
| Carbono total (mg/L C) | 30,87 | 31,99 | 29,49 | 30,78 |
| Desv.Est. | 1,37 | 1,92 | 2,11 | 1,97 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 25,29 | 25,18 | 23,81 | 24,76 |
| Desv.Est. | 1,80 | 2,47 | 3,97 | 2,71 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 5,58 | 6,81 | 5,68 | 6,02 |
| Desv.Est. | 2,49 | 3,83 | 2,51 | 2,78 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 30,6 | 29,4 | 27,7 | 29,3 |
| Desv.Est. | 24,3 | 24,7 | 28,8 | 23,6 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 32,9 | 27,5 | 21,1 | 27,2 |
| Desv.Est. | 40,4 | 32,2 | 19,2 | 29,2 |
| Cobre (mg/L Cu) | 0,003 | 0,002 | 0,004 | 0,003 |
| Desv.Est. | 0,001 | 0,001 | 0,003 | 0,002 |
| Plomo (mg/L Pb) | 0,001 | <0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Desv.Est. | 0,001 | --- | 0,001 | 0,001 |
| Cadmio (mg/ L Cd) | 0,00016 | 0,00010 | 0,00009 | 0,00011 |
| Desv.Est. | 0,00010 | 0,00008 | 0,00003 | 0,00004 |
| Zinc (mg/L Zn) | 0,005 | 0,003 | 0,009 | 0,006 |
| Desv.Est. | 0,003 | 0,002 | 0,012 | 0,007 |

Tabla C II.36. Promedio de las variables físico-químicas. Transecto C3

| Parámetros \ Estaciones | C3A | C3B | C3C | C3 |
|---|------------------|------------------|------------------|----------------|
| pH | 8,14 | 8,18 | 8,14 | 8,15 |
| Desv.Est. | 0,06 | 0,07 | 0,06 | 0,06 |
| Temperatura (°C) | 17,6 | 17,5 | 17,6 | 17,6 |
| Desv.Est. | 4,9 | 5,0 | 4,9 | 4,4 |
| Salinidad | 37,1 | 37,1 | 37,3 | 37,2 |
| Desv.Est. | 0,9 | 0,9 | 0,6 | 0,7 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,027 | 0,020 | 0,026 | 0,024 |
| Desv.Est. | 0,028 | 0,018 | 0,017 | 0,020 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,011 | 0,007 | 0,007 | 0,008 |
| Desv.Est. | 0,011 | 0,008 | 0,006 | 0,008 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,039 | 0,038 | 0,044 | 0,040 |
| Desv.Est. | 0,035 | 0,022 | 0,031 | 0,027 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | 0,010 | <0,010 | <0,010 | 0,010 |
| Desv.Est. | 0,003 | --- | --- | 0,003 |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,101 | 0,075 | 0,099 | 0,092 |
| Desv.Est. | 0,082 | 0,043 | 0,059 | 0,059 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,208 | 0,269 | 0,252 | 0,243 |
| Desv.Est. | 0,184 | 0,238 | 0,275 | 0,206 |
| Carbono total (mg/L C) | 30,77 | 30,25 | 31,37 | 30,80 |
| Desv.Est. | 1,37 | 2,11 | 1,98 | 1,74 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 25,15 | 24,80 | 25,26 | 25,07 |
| Desv.Est. | 2,30 | 2,59 | 3,37 | 2,53 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 5,62 | 5,42 | 6,11 | 5,72 |
| Desv.Est. | 2,23 | 1,81 | 2,93 | 2,16 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 29,1 | 29,1 | 38,9 | 32,3 |
| Desv.Est. | 24,4 | 20,0 | 24,7 | 21,5 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 25,0 | 23,4 | 22,4 | 23,6 |
| Desv.Est. | 19,1 | 12,7 | 14,8 | 14,3 |
| Cobre (mg/L Cu) | 0,002 | 0,002 | 0,007 | 0,003 |
| Desv.Est. | 0,000 | 0,000 | 0,009 | 0,005 |
| Plomo (mg/L Pb) | <0,001 | 0,001 | <0,001 | 0,001 |
| Desv.Est. | --- | 0,001 | --- | 0,001 |
| Cadmio (mg/ L Cd) | 0,00191 | 0,00005 | 0,00010 | 0,00068 |
| Desv.Est. | 0,00371 | 0,00001 | 0,00007 | 0,00092 |
| Zinc (mg/L Zn) | 0,004 | 0,003 | 0,003 | 0,003 |
| Desv.Est. | 0,003 | 0,001 | 0,000 | 0,002 |

Tabla C II.37. Promedio de las variables físico-químicas. Transecto C4

| Parámetros \ Estaciones | C4A | C4B | C4 |
|---|------------------|----------------|----------------|
| pH | 8,21 | 8,27 | 8,24 |
| Desv.Est. | 0,08 | 0,16 | 0,12 |
| Temperatura (°C) | 17,9 | 17,9 | 17,9 |
| Desv.Est. | 5,2 | 4,6 | 4,5 |
| Salinidad | 37,5 | 37,9 | 37,7 |
| Desv.Est. | 0,4 | 0,9 | 0,7 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,024 | 0,027 | 0,026 |
| Desv.Est. | 0,022 | 0,025 | 0,022 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,008 | 0,029 | 0,018 |
| Desv.Est. | 0,008 | 0,037 | 0,027 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,032 | 0,027 | 0,030 |
| Desv.Est. | 0,018 | 0,028 | 0,022 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | 0,014 | 0,014 | 0,014 |
| Desv.Est. | 0,002 | 0,003 | 0,002 |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,161 | 0,165 | 0,163 |
| Desv.Est. | 0,095 | 0,062 | 0,074 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,292 | 0,381 | 0,337 |
| Desv.Est. | 0,358 | 0,507 | 0,395 |
| Carbono total (mg/L C) | 32,84 | 31,43 | 32,13 |
| Desv.Est. | 1,84 | 3,65 | 2,78 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 26,33 | 24,60 | 25,47 |
| Desv.Est. | 2,23 | 6,11 | 4,36 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 6,51 | 6,82 | 6,67 |
| Desv.Est. | 2,82 | 3,36 | 2,88 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 31,1 | 29,7 | 30,4 |
| Desv.Est. | 20,6 | 25,0 | 21,2 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 19,3 | 19,9 | 19,6 |
| Desv.Est. | 13,4 | 16,0 | 13,7 |
| Cobre (mg/L Cu) | 0,002 | 0,002 | 0,002 |
| Desv.Est. | 0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Plomo (mg/L Pb) | <0,001 | 0,001 | 0,001 |
| Desv.Est. | --- | 0,001 | 0,001 |
| Cadmio (mg/L Cd) | 0,00013 | 0,00010 | 0,00012 |
| Desv.Est. | 0,00019 | 0,00004 | 0,00010 |
| Zinc (mg/L Zn) | 0,003 | 0,003 | 0,003 |
| Desv.Est. | 0,001 | 0,002 | 0,001 |

Tabla C II.38. Promedio de las variables físico-químicas. Transecto C5

| Parámetros \ Estaciones | C5A | C5B | C5C | C5D | C5E | C5F | C5 |
|---|----------------|------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| pH | 7,99 | 8,12 | 8,07 | 8,29 | 8,03 | 8,03 | 8,09 |
| Desv.Est. | 0,04 | 0,12 | 0,13 | 0,27 | 0,06 | 0,17 | 0,17 |
| Temperatura (°C) | 18,9 | 19,0 | 18,7 | 18,7 | 18,9 | 17,8 | 18,6 |
| Desv.Est. | 8,1 | 5,4 | 5,6 | 5,7 | 5,8 | 3,9 | 4,6 |
| Salinidad | 35,0 | 37,7 | 36,8 | 37,0 | 37,7 | 38,1 | 37,2 |
| Desv.Est. | 2,8 | 1,2 | 0,3 | 0,0 | 0,6 | 0,6 | 1,3 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,193 | <0,010 | 0,030 | 0,011 | 0,091 | 0,112 | 0,070 |
| Desv.Est. | 0,190 | --- | 0,019 | 0,007 | 0,051 | 0,041 | 0,081 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,014 | 0,003 | 0,004 | 0,003 | 0,016 | 0,023 | 0,011 |
| Desv.Est. | 0,014 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,005 | 0,004 | 0,010 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,434 | 0,042 | 0,076 | 0,057 | 0,181 | 0,060 | 0,121 |
| Desv.Est. | 0,398 | 0,016 | 0,013 | 0,036 | 0,135 | 0,056 | 0,166 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | 0,029 | <0,010 | <0,010 | 0,010 | 0,037 | 0,051 | 0,025 |
| Desv.Est. | 0,004 | --- | --- | 0,003 | 0,020 | 0,011 | 0,020 |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,192 | 0,040 | 0,049 | 0,092 | 0,200 | 0,250 | 0,140 |
| Desv.Est. | 0,024 | 0,017 | 0,021 | 0,067 | 0,079 | 0,079 | 0,100 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,181 | 0,224 | 0,210 | 0,236 | 0,435 | 0,527 | 0,309 |
| Desv.Est. | 0,200 | 0,186 | 0,237 | 0,277 | 0,442 | 0,506 | 0,313 |
| Carbono total (mg/L C) | 30,90 | 31,26 | 32,71 | 33,57 | 33,24 | 33,83 | 32,75 |
| Desv.Est. | 4,07 | 2,10 | 1,13 | 2,18 | 4,26 | 4,42 | 3,00 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 24,61 | 24,61 | 25,20 | 25,86 | 27,92 | 27,04 | 26,01 |
| Desv.Est. | 6,63 | 3,57 | 3,39 | 3,76 | 2,32 | 5,18 | 3,75 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 6,29 | 6,64 | 7,52 | 7,71 | 5,32 | 6,78 | 6,74 |
| Desv.Est. | 2,56 | 1,93 | 3,66 | 3,44 | 2,13 | 1,66 | 2,34 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 54,0 | 38,2 | 30,7 | 36,0 | 39,0 | 166,5 | 67,0 |
| Desv.Est. | 53,7 | 34,5 | 30,4 | 28,0 | 30,3 | 132,2 | 82,1 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 14,6 | 24,2 | 21,9 | 28,7 | 20,6 | 25,0 | 23,0 |
| Desv.Est. | 10,5 | 15,2 | 18,5 | 24,5 | 14,1 | 21,2 | 16,2 |
| Cobre (mg/L Cu) | 0,005 | 0,002 | 0,003 | 0,002 | 0,003 | 0,005 | 0,003 |
| Desv.Est. | 0,003 | 0,000 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,002 |
| Plomo (mg/L Pb) | 0,002 | <0,001 | 0,005 | 0,002 | 0,002 | 0,005 | 0,003 |
| Desv.Est. | 0,000 | --- | 0,006 | 0,000 | 0,000 | 0,005 | 0,003 |
| Cadmio (mg/ L Cd) | 0,00032 | 0,00009 | 0,00014 | 0,00003 | 0,00018 | 0,00009 | 0,00014 |
| Desv.Est. | 0,00032 | 0,00001 | 0,00006 | --- | 0,00009 | 0,00007 | 0,00012 |
| Zinc (mg/L Zn) | 0,007 | 0,004 | 0,006 | 0,004 | 0,006 | 0,013 | 0,007 |
| Desv.Est. | 0,001 | 0,002 | 0,004 | 0,002 | 0,004 | 0,010 | 0,006 |

Tabla C II.39. Promedio de las variables físico-químicas. BAHÍA DE CÁDIZ

| Datos | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | Bahía de Cádiz |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS | | | | | | |
| C. fecales (UFC/100 mL) | 2.00E+01 | 1.00E+01 | 1.00E+01 | 1.00E+01 | --- | 1.25E+01 |
| Desv. Est. | 1.73E+01 | 0.00E+00 | 0.00E+00 | 0.00E+00 | --- | 8.66E+00 |
| E. fecales (UFC/100 mL) | 4.67E+01 | 1.67E+01 | 2.33E+01 | 2.00E+01 | --- | 2.83E+01 |
| Desv. Est. | 3.06E+01 | 5.77E+00 | 1.53E+01 | 0.00E+00 | --- | 1.95E+01 |
| PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS | | | | | | |
| pH | 8,11 | 8,11 | 8,15 | 8,24 | 8,09 | 8,13 |
| Desv.Est. | 0,03 | 0,06 | 0,06 | 0,12 | 0,17 | 0,11 |
| Temperatura (°C) | 17,7 | 17,9 | 17,6 | 17,9 | 18,6 | 18,0 |
| Desv.Est. | 4,0 | 4,2 | 4,4 | 4,5 | 4,6 | 4,3 |
| Salinidad | 37,0 | 37,3 | 37,2 | 37,7 | 37,2 | 37,2 |
| Desv.Est. | 1,3 | 1,4 | 0,7 | 0,7 | 1,3 | 1,2 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,020 | 0,028 | 0,024 | 0,026 | 0,070 | 0,037 |
| Desv.Est. | 0,020 | 0,031 | 0,020 | 0,022 | 0,081 | 0,050 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,005 | 0,004 | 0,008 | 0,018 | 0,011 | 0,009 |
| Desv.Est. | 0,005 | 0,003 | 0,008 | 0,027 | 0,010 | 0,012 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,059 | 0,088 | 0,040 | 0,030 | 0,121 | 0,074 |
| Desv.Est. | 0,049 | 0,131 | 0,027 | 0,022 | 0,166 | 0,109 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | 0,009 | 0,008 | 0,010 | 0,014 | 0,025 | 0,014 |
| Desv.Est. | 0,005 | 0,004 | 0,003 | 0,002 | 0,020 | 0,013 |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,068 | 0,059 | 0,092 | 0,163 | 0,140 | 0,102 |
| Desv.Est. | 0,071 | 0,028 | 0,059 | 0,074 | 0,100 | 0,081 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,112 | 0,136 | 0,243 | 0,337 | 0,309 | 0,227 |
| Desv.Est. | 0,070 | 0,070 | 0,206 | 0,395 | 0,313 | 0,248 |
| Carbono total (mg/L C) | 31,02 | 30,78 | 30,80 | 32,13 | 32,75 | 31,54 |
| Desv.Est. | 2,77 | 1,97 | 1,74 | 2,78 | 3,00 | 2,62 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 24,87 | 24,76 | 25,07 | 25,47 | 26,01 | 25,27 |
| Desv.Est. | 2,57 | 2,71 | 2,53 | 4,36 | 3,75 | 3,13 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 6,27 | 6,02 | 5,72 | 6,67 | 6,74 | 6,30 |
| Desv.Est. | 3,36 | 2,78 | 2,16 | 2,88 | 2,34 | 2,68 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 30,0 | 29,3 | 32,3 | 30,4 | 67,0 | 40,4 |
| Desv.Est. | 21,8 | 23,6 | 21,5 | 21,2 | 82,1 | 48,6 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 18,8 | 27,2 | 23,6 | 19,6 | 23,0 | 22,4 |
| Desv.Est. | 15,2 | 29,2 | 14,3 | 13,7 | 16,2 | 18,2 |
| Clorofila a (mg/m³) | 0,790 | 0,949 | 0,971 | 1,323 | 1,008 | 1,008 () |
| Desv.Est. | 0,213 | 0,379 | 0,277 | 0,558 | 0,225 | 0,195 |
| Dureza cálcica (mg/L CaCO₃) | 676,7 | 674,0 | 672,0 | 666,0 | 662,7 | 670,3 |
| Desv.Est. | --- | --- | --- | --- | --- | 5,8 |
| Tensioactivos aniónicos (mg/L LAS) | --- | --- | --- | 14,3 | 32,2 () | --- |
| Desv.Est. | --- | --- | --- | --- | 28,0 | --- |
| Fenoles (mg/L C₆H₅OH) | no detectado | | | | | |
| Desv.Est. | no detectado | | | | | |
| Aceites y Grasas (mg/L) | < 2,0 | < 2,0 | < 2,0 | < 2,0 | 9,6 | 2,7 |
| Desv.Est. | --- | --- | --- | --- | 0,3 | 3,8 |
| Cobre (mg/L Cu) | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,002 | 0,003 | 0,003 |
| Desv.Est. | 0,001 | 0,002 | 0,005 | 0,001 | 0,002 | 0,003 |
| Plomo (mg/L Pb) | 0,002 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,003 | 0,002 |
| Desv.Est. | 0,001 | 0,001 | 0,000 | 0,000 | 0,003 | 0,002 |
| Cadmio (mg/ L Cd) | 0,00026 | 0,00011 | 0,00068 | 0,00012 | 0,00016 | 0,00026 |
| Desv.Est. | 0,00022 | 0,00004 | 0,00092 | 0,00010 | 0,00012 | 0,00024 |
| Zinc (mg/L Zn) | 0,008 | 0,006 | 0,003 | 0,003 | 0,007 | 0,006 |
| Desv.Est. | 0,007 | 0,007 | 0,002 | 0,001 | 0,006 | 0,006 |

n.d.: no determinado; () Promedio de las estaciones C5A, C5E y C5F; () Datos sólo de C5F

4.2.2. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS TRANSECTOS DE LA BAHÍA DE CÁDIZ

La estadística descriptiva de los transectos de la Bahía de Cádiz se ha realizado mediante el paquete estadístico Statistica 6,0 (StatSoft, 1997).

Con objeto de obtener resultados representativos, los parámetros seleccionados para este análisis estadístico son aquellos que se han determinado con más frecuencia y en todas las estaciones de muestreo. Estos son:

- pH
- Temperatura
- Salinidad
- Amonio
- Nitritos
- Nitratos
- Fosfatos
- Fósforo total
- Silicatos
- Carbono disuelto
- Carbono inorgánico disuelto
- Carbono orgánico disuelto
- Sólidos en suspensión
- Sólidos volátiles
- Cobre
- Plomo
- Cadmio
- Zinc

Algunos parámetros sólo se han medido en las muestras compuestas representativas de cada transecto. Debido al escaso número de datos, estos análisis no se han incluido en el análisis estadístico. Estos parámetros son:

- Coliformes fecales
- Estreptococos fecales
- Tensioactivos aniónicos
- Índice de fenoles
- Grasas y aceites
- Clorofila
- Dureza cálcica

Tabla C II.40. Estudio estadístico del transecto C1 de la Bahía de Cádiz

| C1 | N Válidos | IntConf. -95% | Media | IntConf. +95% | Desv. Est. | Mediana | Mínimo | Máximo | Cuartil Inferior | Cuartil Superior | Varianza |
|------------------------------------|--------------|------------------|----------|------------------|---------------|----------|----------|----------|---------------------|---------------------|----------|
| pH | 16 | 8,09 | 8,11 | 8,12 | 0,03 | 8,12 | 8,06 | 8,17 | 8,07 | 8,13 | 1,20E-03 |
| T (°C) | 16 | 15,6 | 17,7 | 19,8 | 4,0 | 17,1 | 12,8 | 23,5 | 14,3 | 21,1 | 1,61E+01 |
| S | 16 | 36,3 | 37,0 | 37,7 | 1,3 | 36,8 | 35,0 | 40,0 | 36,0 | 38,0 | 1,75E+00 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 16 | 0,009 | 0,020 | 0,031 | 0,020 | 0,017 | 0,001 | 0,067 | 0,004 | 0,023 | 4,14E-04 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 16 | 0,003 | 0,005 | 0,008 | 0,005 | 0,004 | 0,001 | 0,021 | 0,002 | 0,007 | 2,65E-05 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 16 | 0,033 | 0,059 | 0,085 | 0,049 | 0,057 | 0,000 | 0,165 | 0,013 | 0,085 | 2,41E-03 |
| ΣN (mg/L N) | 16 | 0,059 | 0,084 | 0,110 | 0,047 | 0,071 | 0,030 | 0,207 | 0,059 | 0,099 | 2,23E-03 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 16 | 0,006 | 0,009 | 0,011 | 0,005 | 0,009 | 0,000 | 0,016 | 0,007 | 0,012 | 2,14E-05 |
| P total (mg/L P) | 16 | 0,030 | 0,068 | 0,106 | 0,071 | 0,041 | 0,022 | 0,313 | 0,031 | 0,081 | 4,99E-03 |
| Si (mg/L Si-SiO ₄) | 12 | 0,068 | 0,112 | 0,156 | 0,070 | 0,093 | 0,000 | 0,218 | 0,071 | 0,169 | 4,84E-03 |
| CT (mg/L C) | 16 | 4,47 | 6,27 | 8,06 | 3,36 | 4,64 | 3,40 | 13,95 | 3,67 | 8,34 | 7,66E+00 |
| Cl (mg/L C) | 16 | 18,39 | 30,00 | 41,61 | 21,79 | 19,00 | 10,80 | 68,00 | 15,09 | 45,10 | 6,59E+00 |
| COT (mg/L C) | 16 | 10,68 | 18,79 | 26,90 | 15,22 | 9,75 | 6,40 | 49,00 | 8,05 | 28,00 | 1,13E+01 |
| SS (mg/L) | 16 | 29,5 | 31,0 | 32,5 | 2,8 | 30,7 | 26,7 | 36,9 | 29,3 | 31,9 | 4,75E+02 |
| SV (mg/L) | 16 | 23,5 | 24,9 | 26,2 | 2,6 | 25,8 | 17,1 | 27,3 | 24,3 | 26,4 | 2,32E+02 |
| Cu (mg/L Cu) | 16 | 0,003 | 0,003 | 0,004 | 0,001 | 0,003 | 0,002 | 0,006 | 0,002 | 0,004 | 1,02E-06 |
| Pb (mg/L Pb) | 16 | 0,001 | 0,002 | 0,003 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,006 | 0,001 | 0,002 | 2,19E-06 |
| Cd (mg/L Cd) | 16 | -3,2E-06 | 2,55E-04 | 5,13E-04 | 4,85E-04 | 1,00E-04 | 3,00E-05 | 2,03E-03 | 6,00E-05 | 2,10E-04 | 2,35E-04 |
| Zn (mg/L Zn) | 16 | 0,004 | 0,008 | 0,011 | 0,007 | 0,006 | 0,003 | 0,030 | 0,004 | 0,009 | 4,38E-05 |
| Σ Metales (mg/L) | 16 | 0,0090 | 0,0131 | 0,0172 | 0,0077 | 0,0104 | 0,0060 | 0,0361 | 0,0088 | 0,0159 | 5,99E-05 |

Tabla C II.41. Estudio estadístico del transecto C2 de la Bahía de Cádiz

| C2 | N Válidos | IntConf. -95% | Media | IntConf. +95% | Desv. Est. | Mediana | Mínimo | Máximo | Cuartil Inferior | Cuartil Superior | Varianza |
|------------------------------------|--------------|------------------|----------|------------------|---------------|----------|----------|----------|---------------------|---------------------|----------|
| pH | 12 | 8,07 | 8,11 | 8,15 | 0,06 | 8,12 | 7,95 | 8,18 | 8,08 | 8,15 | 3,88E-03 |
| T (°C) | 12 | 15,2 | 17,9 | 20,6 | 4,2 | 17,6 | 12,9 | 24,0 | 14,2 | 21,4 | 1,77E+01 |
| S | 12 | 36,4 | 37,3 | 38,2 | 1,4 | 37,3 | 35,0 | 40,0 | 36,3 | 38,3 | 2,06E+00 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 12 | 0,008 | 0,028 | 0,048 | 0,031 | 0,018 | 0,000 | 0,112 | 0,010 | 0,037 | 9,60E-04 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 12 | 0,002 | 0,004 | 0,006 | 0,003 | 0,004 | 0,000 | 0,012 | 0,003 | 0,005 | 9,79E-06 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 12 | 0,005 | 0,088 | 0,172 | 0,131 | 0,049 | 0,000 | 0,481 | 0,017 | 0,102 | 1,73E-02 |
| ΣN (mg/L N) | 12 | 0,045 | 0,121 | 0,197 | 0,119 | 0,074 | 0,052 | 0,481 | 0,057 | 0,134 | 1,43E-02 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 12 | 0,006 | 0,008 | 0,011 | 0,004 | 0,009 | 0,001 | 0,016 | 0,005 | 0,012 | 1,84E-05 |
| P total (mg/L P) | 12 | 0,042 | 0,060 | 0,077 | 0,028 | 0,055 | 0,024 | 0,113 | 0,037 | 0,076 | 7,93E-04 |
| Si (mg/L Si-SiO ₄) | 9 | 0,082 | 0,136 | 0,190 | 0,070 | 0,108 | 0,060 | 0,225 | 0,065 | 0,197 | 4,91E-03 |
| CT (mg/L C) | 12 | 4,25 | 6,02 | 7,79 | 2,78 | 5,27 | 3,23 | 12,19 | 3,77 | 7,87 | 3,88E+00 |
| Cl (mg/L C) | 12 | 14,29 | 29,25 | 44,22 | 23,55 | 21,22 | 6,70 | 70,00 | 12,69 | 44,60 | 7,35E+00 |
| COT (mg/L C) | 12 | 8,62 | 27,18 | 45,73 | 29,20 | 15,10 | 5,80 | 93,00 | 8,42 | 34,21 | 7,73E+00 |
| SS (mg/L) | 12 | 29,5 | 30,8 | 32,0 | 2,0 | 31,2 | 27,0 | 33,9 | 29,1 | 32,0 | 5,55E+02 |
| SV (mg/L) | 12 | 23,0 | 24,8 | 26,5 | 2,7 | 25,6 | 17,9 | 27,5 | 24,0 | 26,3 | 8,53E+02 |
| Cu (mg/L Cu) | 12 | 0,002 | 0,003 | 0,004 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,008 | 0,002 | 0,003 | 2,73E-06 |
| Pb (mg/L Pb) | 12 | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,001 | 0,001 | 0,000 | 0,003 | 0,001 | 0,002 | 4,99E-07 |
| Cd (mg/L Cd) | 12 | 6,5E-05 | 1,14E-04 | 1,63E-04 | 7,67E-05 | 1,00E-04 | 2,00E-05 | 2,70E-04 | 6,00E-05 | 1,60E-04 | 5,88E-06 |
| Zn (mg/L Zn) | 12 | 0,002 | 0,006 | 0,010 | 0,007 | 0,004 | 0,001 | 0,026 | 0,002 | 0,007 | 4,71E-05 |
| Σ Metales (mg/L) | 12 | 0,0049 | 0,0103 | 0,0157 | 0,0085 | 0,0078 | 0,0044 | 0,0359 | 0,0058 | 0,0108 | 7,19E-05 |

Tabla C II.42. Estudio estadístico del transecto C3 de la Bahía de Cádiz

| C3 | N Válidos | IntConf. -95% | Media | IntConf. +95% | Desv. Est. | Mediana | Mínimo | Máximo | Cuartil Inferior | Cuartil Superior | Varianza |
|------------------------------------|-----------|------------------|----------|------------------|---------------|----------|----------|----------|---------------------|---------------------|----------|
| pH | 12 | 8,11 | 8,15 | 8,19 | 0,06 | 8,16 | 8,07 | 8,24 | 8,10 | 8,21 | 3,85E-03 |
| T (°C) | 12 | 14,7 | 17,6 | 20,4 | 4,4 | 17,0 | 12,8 | 23,4 | 13,5 | 21,6 | 1,98E+01 |
| S | 12 | 36,7 | 37,2 | 37,6 | 0,7 | 37,3 | 36,0 | 38,0 | 36,8 | 37,8 | 5,15E-01 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 12 | 0,012 | 0,024 | 0,037 | 0,020 | 0,014 | 0,006 | 0,068 | 0,009 | 0,038 | 3,97E-04 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 12 | 0,003 | 0,008 | 0,013 | 0,008 | 0,004 | 0,002 | 0,025 | 0,003 | 0,013 | 6,14E-05 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 12 | 0,023 | 0,040 | 0,057 | 0,027 | 0,044 | 0,000 | 0,072 | 0,014 | 0,065 | 7,16E-04 |
| ΣN (mg/L N) | 12 | 0,058 | 0,073 | 0,088 | 0,023 | 0,072 | 0,031 | 0,116 | 0,061 | 0,081 | 5,49E-04 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 12 | 0,008 | 0,010 | 0,012 | 0,003 | 0,009 | 0,004 | 0,016 | 0,007 | 0,012 | 1,06E-05 |
| P total (mg/L P) | 12 | 0,054 | 0,092 | 0,129 | 0,059 | 0,078 | 0,038 | 0,222 | 0,049 | 0,110 | 3,46E-03 |
| Si (mg/L Si-SiO ₄) | 9 | 0,085 | 0,243 | 0,401 | 0,206 | 0,143 | 0,040 | 0,563 | 0,109 | 0,420 | 4,24E-02 |
| CT (mg/L C) | 12 | 4,34 | 5,72 | 7,09 | 2,16 | 5,30 | 3,55 | 9,76 | 3,74 | 7,12 | 3,03E+00 |
| Cl (mg/L C) | 12 | 18,70 | 32,34 | 45,97 | 21,46 | 20,79 | 10,36 | 73,00 | 19,40 | 49,95 | 6,41E+00 |
| COT (mg/L C) | 12 | 14,48 | 23,57 | 32,66 | 14,31 | 17,60 | 8,56 | 52,22 | 14,32 | 32,50 | 4,68E+00 |
| SS (mg/L) | 12 | 29,7 | 30,8 | 31,9 | 1,7 | 30,5 | 28,0 | 34,2 | 29,7 | 31,9 | 4,61E+02 |
| SV (mg/L) | 12 | 23,5 | 25,1 | 26,7 | 2,5 | 26,0 | 20,2 | 27,4 | 23,7 | 26,8 | 2,05E+02 |
| Cu (mg/L Cu) | 12 | 0,000 | 0,003 | 0,007 | 0,005 | 0,002 | 0,001 | 0,020 | 0,001 | 0,002 | 2,82E-05 |
| Pb (mg/L Pb) | 12 | 0,001 | 0,001 | 0,001 | 0,000 | 0,001 | 0,000 | 0,002 | 0,001 | 0,001 | 1,60E-07 |
| Cd (mg/L Cd) | 12 | -6,7E-04 | 6,84E-04 | 2,04E-03 | 2,14E-03 | 5,50E-05 | 3,00E-05 | 7,47E-03 | 4,00E-05 | 1,10E-04 | 4,57E-03 |
| Zn (mg/L Zn) | 12 | 0,002 | 0,003 | 0,004 | 0,002 | 0,003 | 0,000 | 0,008 | 0,002 | 0,004 | 3,67E-06 |
| Σ Metales (mg/L) | 12 | 0,0045 | 0,0081 | 0,0118 | 0,0057 | 0,0060 | 0,0045 | 0,0250 | 0,0050 | 0,0091 | 3,28E-05 |

Tabla C II.43. Estudio estadístico del transecto C4 de la Bahía de Cádiz

| C4 | N Válidos | IntConf. -95% | Media | IntConf. +95% | Desv. Est. | Mediana | Mínimo | Máximo | Cuartil Inferior | Cuartil Superior | Varianza |
|------------------------------------|-----------|------------------|--------|------------------|---------------|---------|--------|--------|---------------------|---------------------|----------|
| pH | 8 | 8,14 | 8,24 | 8,34 | 0,12 | 8,20 | 8,14 | 8,51 | 8,17 | 8,27 | 1,29E-02 |
| T (°C) | 8 | 14,1 | 17,9 | 21,7 | 4,5 | 17,5 | 12,5 | 24,3 | 14,2 | 21,6 | 1,90E+01 |
| S | 8 | 37,1 | 37,7 | 38,2 | 0,7 | 37,5 | 37,0 | 39,0 | 37,3 | 38,0 | 3,75E-01 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 8 | 0,008 | 0,026 | 0,044 | 0,022 | 0,024 | 0,000 | 0,061 | 0,009 | 0,040 | 5,16E-04 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 8 | -0,004 | 0,018 | 0,041 | 0,027 | 0,004 | 0,000 | 0,079 | 0,002 | 0,027 | 6,52E-04 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 8 | 0,011 | 0,030 | 0,048 | 0,022 | 0,032 | 0,000 | 0,054 | 0,008 | 0,051 | 4,39E-04 |
| ΣN (mg/L N) | 8 | 0,036 | 0,074 | 0,112 | 0,045 | 0,079 | 0,006 | 0,158 | 0,044 | 0,090 | 1,83E-03 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 8 | 0,012 | 0,014 | 0,016 | 0,002 | 0,013 | 0,011 | 0,017 | 0,012 | 0,016 | 4,54E-06 |
| P total (mg/L P) | 8 | 0,101 | 0,163 | 0,225 | 0,074 | 0,178 | 0,080 | 0,266 | 0,083 | 0,218 | 6,57E-03 |
| Si (mg/L Si-SiO ₄) | 6 | -0,078 | 0,337 | 0,752 | 0,395 | 0,186 | 0,000 | 0,956 | 0,000 | 0,691 | 1,56E-01 |
| CT (mg/L C) | 8 | 4,26 | 6,67 | 9,07 | 2,88 | 5,88 | 4,02 | 11,41 | 4,32 | 8,77 | 7,40E+00 |
| Cl (mg/L C) | 8 | 12,65 | 30,40 | 48,16 | 21,23 | 21,55 | 9,73 | 66,00 | 18,70 | 43,50 | 1,67E+01 |
| COT (mg/L C) | 8 | 8,14 | 19,58 | 31,02 | 13,68 | 14,50 | 7,52 | 43,00 | 9,55 | 29,00 | 8,30E+00 |
| SS (mg/L) | 8 | 29,8 | 32,1 | 34,5 | 2,8 | 32,8 | 27,0 | 35,6 | 30,4 | 34,0 | 4,05E+02 |
| SV (mg/L) | 8 | 21,8 | 25,5 | 29,1 | 4,4 | 26,8 | 15,5 | 28,5 | 24,8 | 28,3 | 1,66E+02 |
| Cu (mg/L Cu) | 8 | 0,002 | 0,002 | 0,003 | 0,001 | 0,002 | 0,001 | 0,003 | 0,002 | 0,003 | 3,46E-07 |
| Pb (mg/L Pb) | 8 | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,000 | 0,001 | 0,001 | 0,002 | 0,001 | 0,001 | 1,83E-07 |
| Cd (mg/L Cd) | 8 | -0,040 | 0,069 | 0,179 | 0,131 | 0,014 | 0,000 | 0,384 | 0,000 | 0,071 | 1,51E-02 |
| Zn (mg/L Zn) | 8 | 0,002 | 0,003 | 0,004 | 0,001 | 0,003 | 0,001 | 0,005 | 0,002 | 0,004 | 1,34E-06 |
| Σ Metales (mg/L) | 8 | 0,0049 | 0,0065 | 0,0080 | 0,0020 | 0,0066 | 0,0035 | 0,0098 | 0,0054 | 0,0075 | 4,14E-06 |

Tabla C II.44. Estudio estadístico del transecto C5 de la Bahía de Cádiz

| C5 | <i>N</i> Válidos | <i>IntConf.</i> -95% | <i>Media</i> | <i>IntConf.</i> +95% | <i>Desv.</i> <i>Est.</i> | <i>Mediana</i> | <i>Mínimo</i> | <i>Máximo</i> | <i>Cuartil</i> <i>Inferior</i> | <i>Cuartil</i> <i>Superior</i> | <i>Varianza</i> |
|------------------------------------|---------------------|-------------------------|--------------|-------------------------|-----------------------------|----------------|---------------|---------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| pH | 18 | 8,01 | 8,09 | 8,17 | 0,17 | 8,07 | 7,80 | 8,60 | 8,02 | 8,16 | 2,76E-02 |
| T (°C) | 18 | 16,3 | 18,6 | 20,9 | 4,6 | 19,8 | 12,5 | 24,6 | 13,2 | 23,5 | 2,16E+01 |
| S | 18 | 36,6 | 37,2 | 37,9 | 1,3 | 37,0 | 33,0 | 39,0 | 37,0 | 38,0 | 1,62E+00 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 18 | 0,029 | 0,070 | 0,110 | 0,081 | 0,049 | 0,001 | 0,328 | 0,014 | 0,099 | 6,64E-03 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 18 | 0,006 | 0,011 | 0,016 | 0,010 | 0,004 | 0,002 | 0,028 | 0,003 | 0,020 | 9,19E-05 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 18 | 0,039 | 0,121 | 0,203 | 0,166 | 0,084 | 0,006 | 0,716 | 0,044 | 0,119 | 2,74E-02 |
| ΣN (mg/L N) | 18 | 0,086 | 0,202 | 0,318 | 0,234 | 0,134 | 0,028 | 1,047 | 0,078 | 0,235 | 5,46E-02 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 18 | 0,016 | 0,025 | 0,035 | 0,020 | 0,017 | 0,003 | 0,062 | 0,010 | 0,038 | 3,93E-04 |
| P total (mg/L P) | 18 | 0,091 | 0,140 | 0,190 | 0,100 | 0,138 | 0,026 | 0,353 | 0,042 | 0,209 | 9,91E-03 |
| Si (mg/L Si-SiO ₄) | 17 | 0,148 | 0,309 | 0,470 | 0,313 | 0,166 | 0,002 | 1,106 | 0,119 | 0,439 | 9,80E-02 |
| CT (mg/L C) | 18 | 31,25 | 32,75 | 34,24 | 3,00 | 32,84 | 27,82 | 38,32 | 31,61 | 33,87 | 9,02E+00 |
| Cl (mg/L C) | 18 | 24,14 | 26,01 | 27,87 | 3,75 | 27,31 | 19,41 | 30,33 | 21,58 | 28,94 | 1,40E+01 |
| COT (mg/L C) | 18 | 5,58 | 6,74 | 7,90 | 2,34 | 7,07 | 3,46 | 11,35 | 4,56 | 8,38 | 5,47E+00 |
| SS (mg/L) | 18 | 26,1 | 67,0 | 107,8 | 82,1 | 25,5 | 7,3 | 280,0 | 19,2 | 78,0 | 6,74E+03 |
| SV (mg/L) | 18 | 14,9 | 23,0 | 31,0 | 16,2 | 20,0 | 6,8 | 56,0 | 8,8 | 35,0 | 2,63E+02 |
| Cu (mg/L Cu) | 18 | 0,003 | 0,003 | 0,004 | 0,002 | 0,003 | 0,002 | 0,007 | 0,002 | 0,004 | 2,80E-06 |
| Pb (mg/L Pb) | 18 | 0,001 | 0,003 | 0,005 | 0,003 | 0,002 | 0,001 | 0,013 | 0,001 | 0,002 | 1,18E-05 |
| Cd (mg/L Cd) | 18 | 1,3E-05 | 1,18E-04 | 2,22E-04 | 1,25E-04 | 7,00E-05 | 3,00E-05 | 4,10E-04 | 4,50E-05 | 1,35E-04 | 1,57E-05 |
| Zn (mg/L Zn) | 18 | 0,004 | 0,007 | 0,010 | 0,006 | 0,005 | 0,002 | 0,026 | 0,004 | 0,009 | 3,10E-05 |
| Σ Metales (mg/L) | 18 | 0,0100 | 0,0145 | 0,0189 | 0,0090 | 0,0110 | 0,0053 | 0,0343 | 0,0077 | 0,0170 | 8,03E-05 |

Tabla C II.45. Estudio estadístico de la Bahía de Cádiz

| Bahía de Cádiz | <i>N</i> Válidos | <i>IntConf.</i> -95% | <i>Media</i> | <i>IntConf.</i> +95% | <i>Desv.</i> <i>Est.</i> | <i>Mediana</i> | <i>Mínimo</i> | <i>Máximo</i> | <i>Cuartil</i> <i>Inferior</i> | <i>Cuartil</i> <i>Superior</i> | <i>Varianza</i> |
|------------------------------------|---------------------|-------------------------|--------------|-------------------------|-----------------------------|----------------|---------------|---------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| pH | 67 | 8,10 | 8,13 | 8,16 | 0,11 | 8,13 | 7,80 | 8,60 | 8,07 | 8,18 | 1,26E-02 |
| T (°C) | 67 | 16,9 | 17,9 | 19,0 | 4,2 | 19,5 | 12,5 | 24,6 | 13,9 | 22,1 | 1,79E+01 |
| S | 67 | 37,0 | 37,2 | 37,5 | 1,2 | 37,5 | 33,0 | 40,0 | 36,5 | 38,0 | 1,33E+00 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 67 | 0,025 | 0,037 | 0,049 | 0,050 | 0,019 | 0,000 | 0,328 | 0,008 | 0,054 | 2,50E-03 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 67 | 0,006 | 0,009 | 0,012 | 0,012 | 0,004 | 0,000 | 0,079 | 0,003 | 0,012 | 1,40E-04 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 67 | 0,047 | 0,073 | 0,100 | 0,109 | 0,051 | 0,000 | 0,716 | 0,021 | 0,083 | 1,18E-02 |
| ΣN (mg/L N) | 67 | 0,085 | 0,119 | 0,154 | 0,142 | 0,078 | 0,006 | 1,047 | 0,059 | 0,119 | 2,01E-02 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 67 | 0,011 | 0,014 | 0,017 | 0,013 | 0,011 | 0,000 | 0,063 | 0,008 | 0,014 | 1,63E-04 |
| P total (mg/L P) | 67 | 0,084 | 0,105 | 0,125 | 0,084 | 0,074 | 0,022 | 0,353 | 0,041 | 0,168 | 6,98E-03 |
| Si (mg/L Si-SiO ₄) | 53 | 0,159 | 0,227 | 0,295 | 0,248 | 0,154 | 0,000 | 1,106 | 0,077 | 0,225 | 6,16E-02 |
| CT (mg/L C) | 67 | 30,88 | 31,51 | 32,15 | 2,61 | 31,44 | 26,66 | 38,32 | 29,54 | 33,02 | 6,79E+00 |
| Cl (mg/L C) | 67 | 24,52 | 25,28 | 26,04 | 3,11 | 26,03 | 15,54 | 30,33 | 23,64 | 27,26 | 9,68E+00 |
| COT (mg/L C) | 67 | 5,60 | 6,26 | 6,91 | 2,68 | 5,61 | 3,23 | 13,95 | 3,89 | 8,10 | 7,18E+00 |
| SS (mg/L) | 67 | 28,7 | 40,4 | 52,2 | 48,2 | 21,0 | 6,7 | 280,0 | 17,9 | 65,0 | 2,33E+03 |
| SV (mg/L) | 67 | 17,9 | 22,3 | 26,7 | 18,0 | 16,0 | 5,8 | 93,0 | 8,8 | 35,0 | 3,26E+02 |
| Cu (mg/L Cu) | 67 | 0,003 | 0,003 | 0,004 | 0,003 | 0,003 | 0,001 | 0,020 | 0,002 | 0,003 | 6,28E-06 |
| Pb (mg/L Pb) | 67 | 0,001 | 0,002 | 0,002 | 0,002 | 0,001 | 0,000 | 0,013 | 0,001 | 0,002 | 4,30E-06 |
| Cd (mg/L Cd) | 67 | 7,6E-05 | 1,37E-04 | 1,97E-04 | 1,21E-04 | 9,00E-05 | 1,00E-05 | 5,40E-04 | 8,00E-05 | 1,80E-04 | 1,47E-05 |
| Zn (mg/L Zn) | 67 | 0,004 | 0,006 | 0,007 | 0,006 | 0,004 | 0,000 | 0,030 | 0,003 | 0,008 | 3,04E-05 |
| Σ Metales (mg/L) | 67 | 0,0093 | 0,0112 | 0,0131 | 0,0078 | 0,0088 | 0,0035 | 0,0361 | 0,0061 | 0,0115 | 6,10E-05 |

4.2.3. HISTOGRAMAS DE FRECUENCIAS. DIAGRAMAS DE DATOS ORDENADOS. DIAGRAMAS DE BOX-WHISKERS.

Se han representado los histogramas de frecuencia, diagramas de datos ordenados y diagramas de box-whiskers de las variables más importantes medidas en la Bahía de Cádiz. Para la elaboración de los histogramas se han seguido las directrices marcadas por la *Guía para la evaluación de la calidad de los datos* publicada por la Oficina de Investigación y Desarrollo de la USEPA (USEPA, 1998).

La primera clase (Clase 0) de cada parámetro está formada por aquellas observaciones cuyos resultados han resultado inferiores a los límites de detección de los métodos analíticos.

Los histogramas de frecuencia de cada parámetro se han construido a partir de un total de 67 casos (excepto para la variable sílice de 53 casos computables) divididos en 10 clases principales de intervalos regulares de concentración seleccionados en función del rango de concentraciones de cada parámetro. Aquellas variables cuyos rangos de concentraciones se encuentran en el rango calculado en la Ría de Huelva, se han mantenido los mismos intervalos de clases. En el caso de variables cuyo rango de concentraciones es muy distinto al de la Ría de Huelva, se ha seleccionado nuevos intervalos de clase acordes con las concentraciones.

Las variables que mantienen los mismos intervalos establecidos en la Ría de Huelva son:

- = Amonio
- = Nitritos
- = Nitratos
- = Nitrógeno
- = Silicatos
- = Sólidos en suspensión
- = Carbono orgánico

Las variables que cambian los intervalos de clases son las siguientes:

- ≠ Fosfatos (hacia niveles inferiores)
- ≠ Fósforo (hacia niveles inferiores)
- ≠ Cobre (hacia niveles inferiores)
- ≠ Plomo (hacia niveles inferiores)
- ≠ Cadmio (hacia niveles inferiores)
- ≠ Zinc (hacia niveles inferiores)
- ≠ Metales (hacia niveles inferiores)

Las consideraciones que se han realizado para la elaboración de estos diagramas en relación con los criterios de selección de clases, expresión de las variables, diseño de los diagramas de cajas y bigotes, y la expresión que definen los valores extremos y los valores anómalos son los mismos que los comentados para la Ría de Huelva.

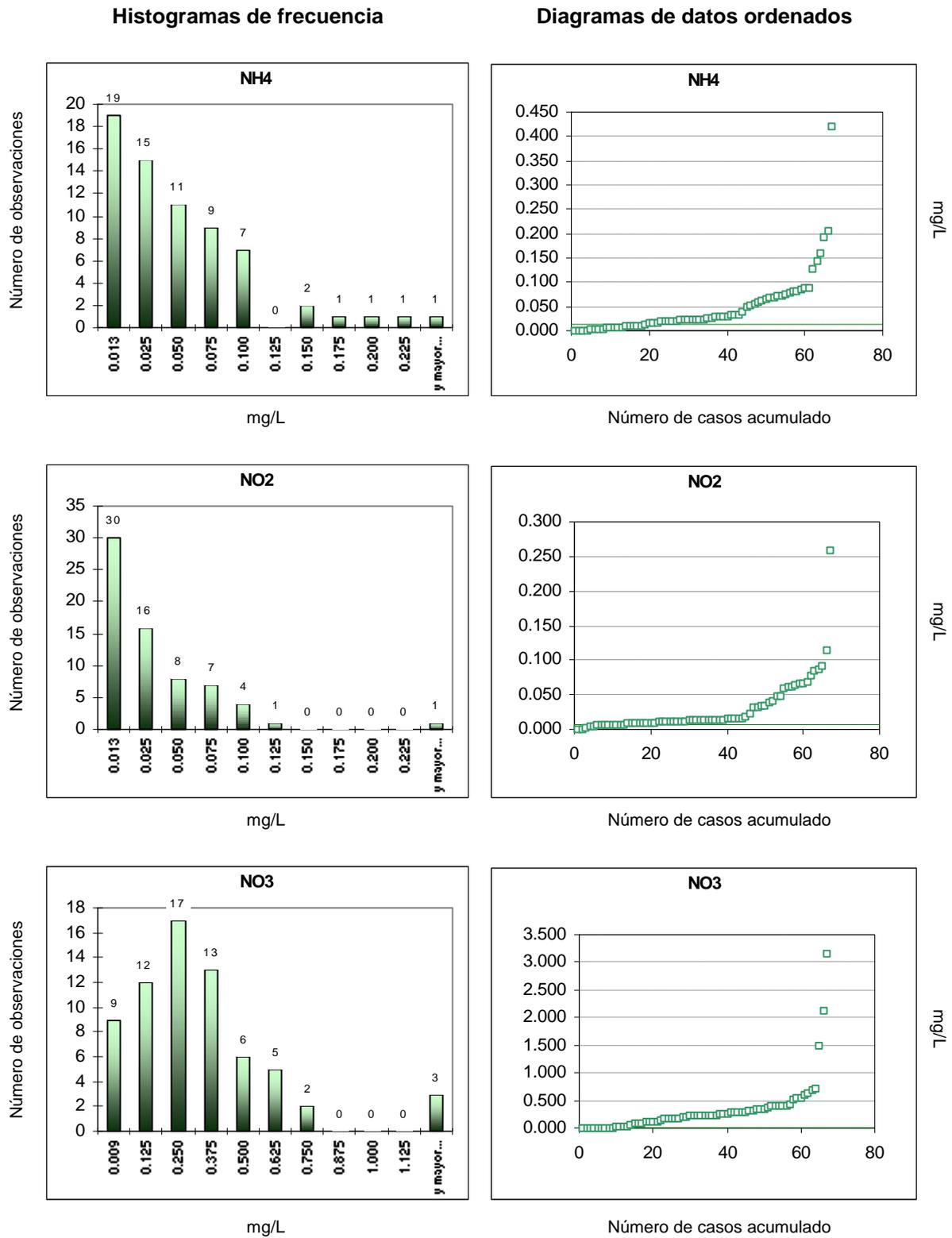


Figura C II.6.
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE CÁDIZ

Diagramas de Box-Whisker

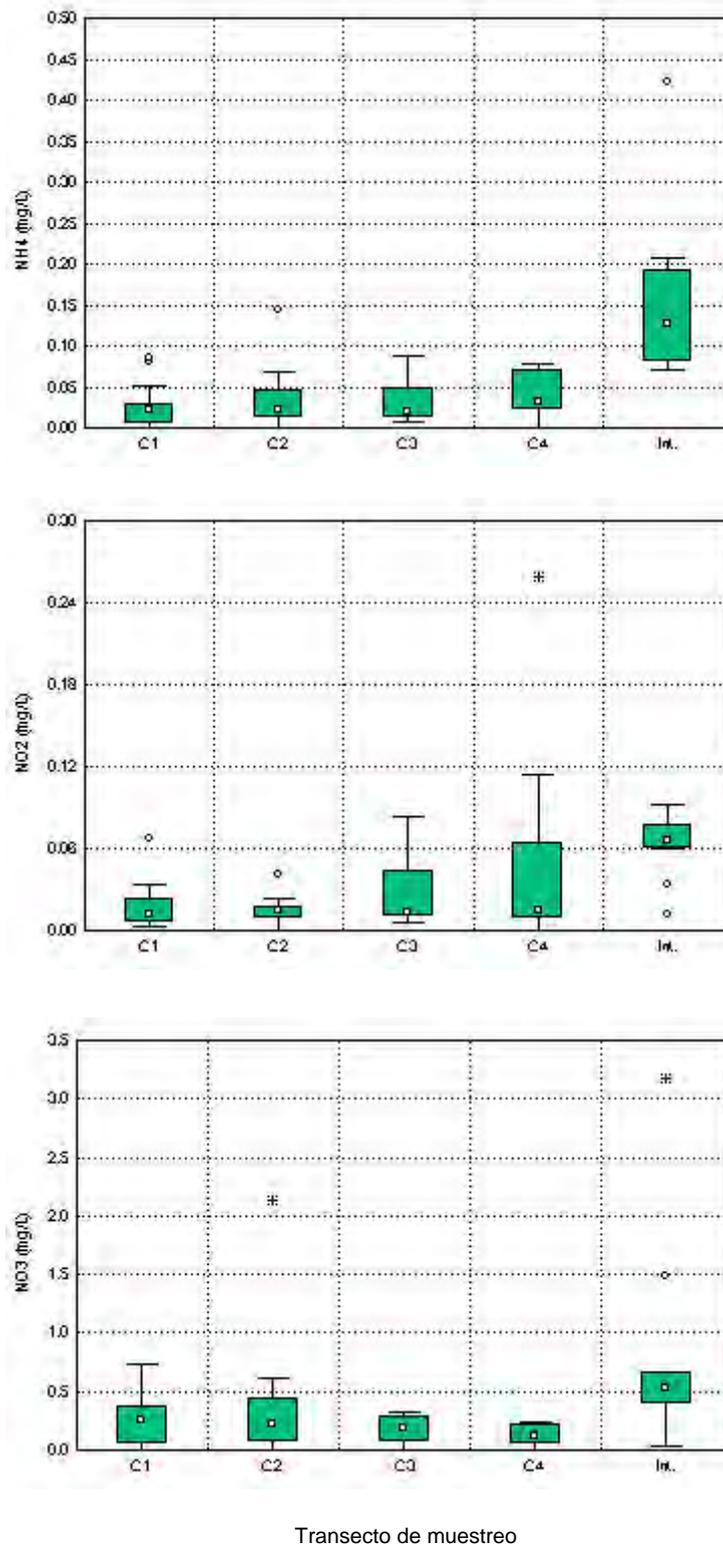


Figura C II.6. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE CÁDIZ

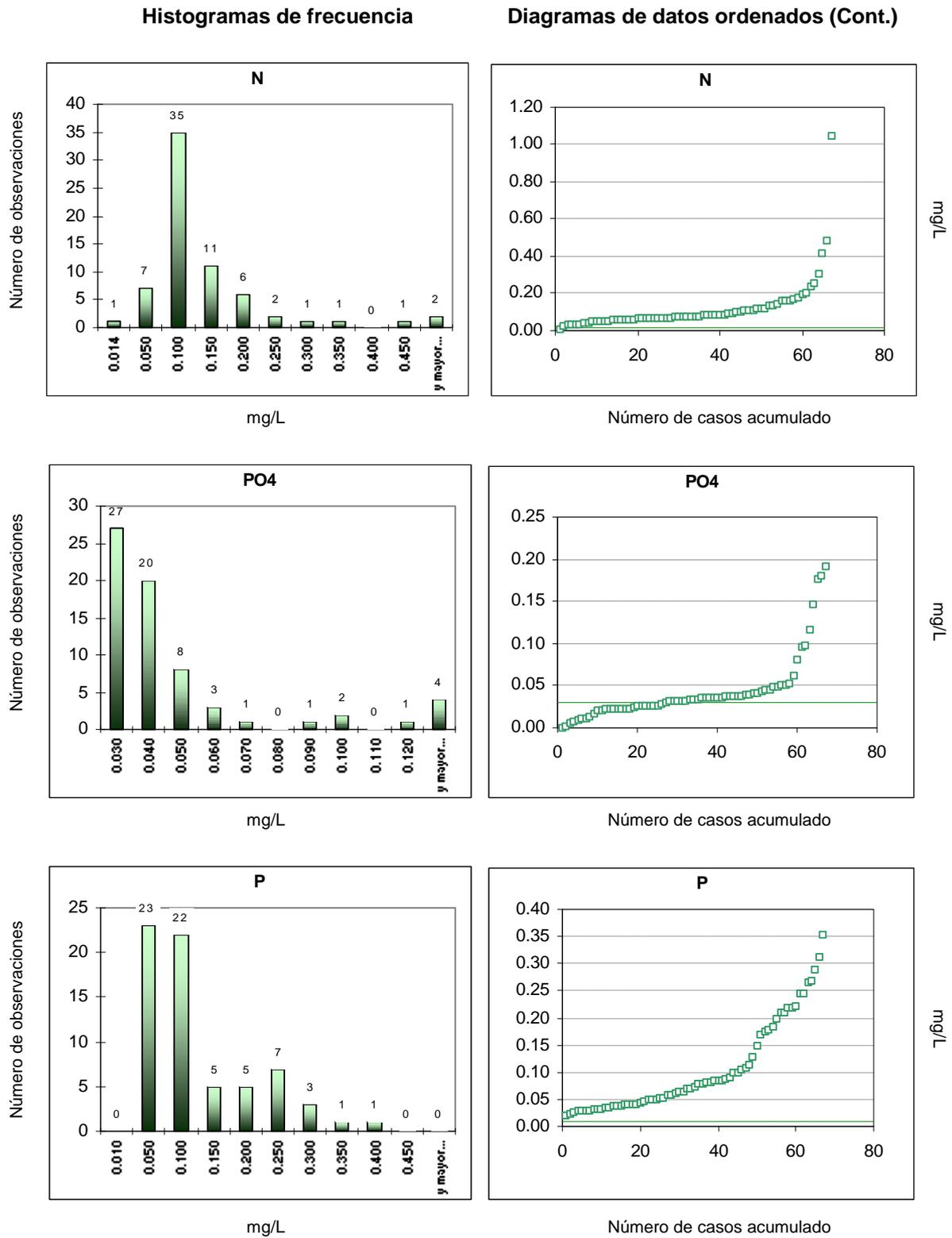
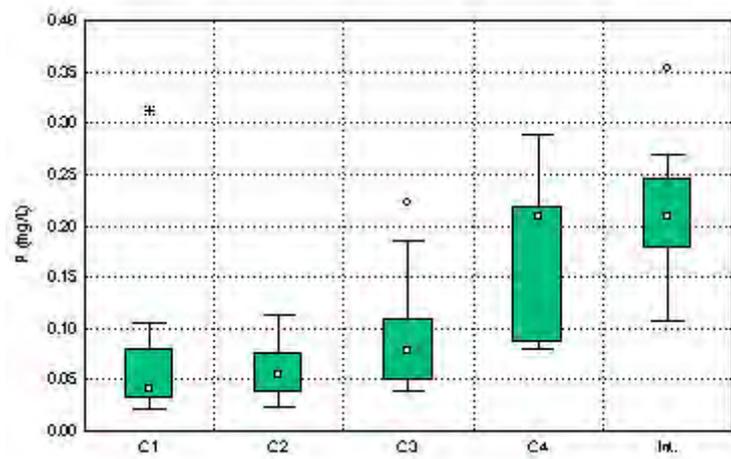
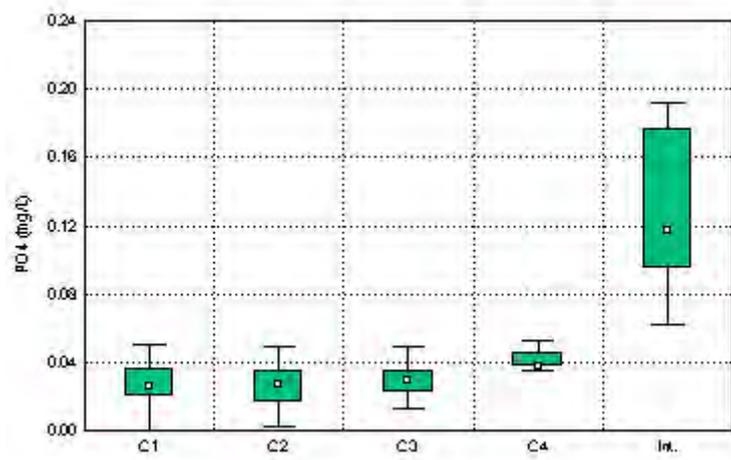
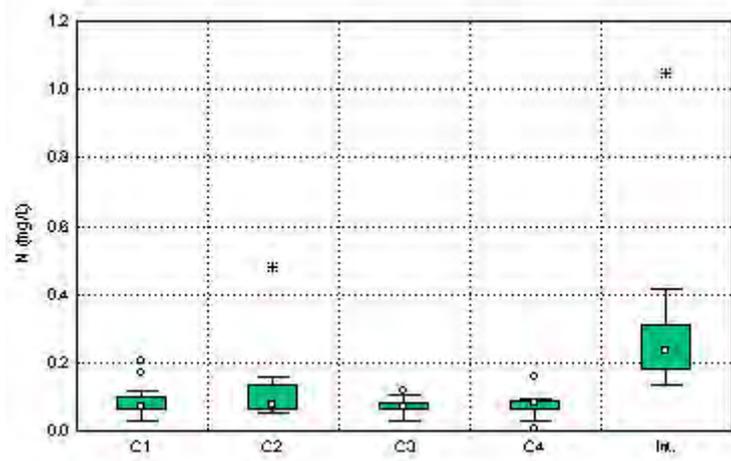


Figura C II.6. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE CÁDIZ

Diagramas de Box-Whisker (Cont.)



Transecto de muestreo

Figura C II.6. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE CÁDIZ

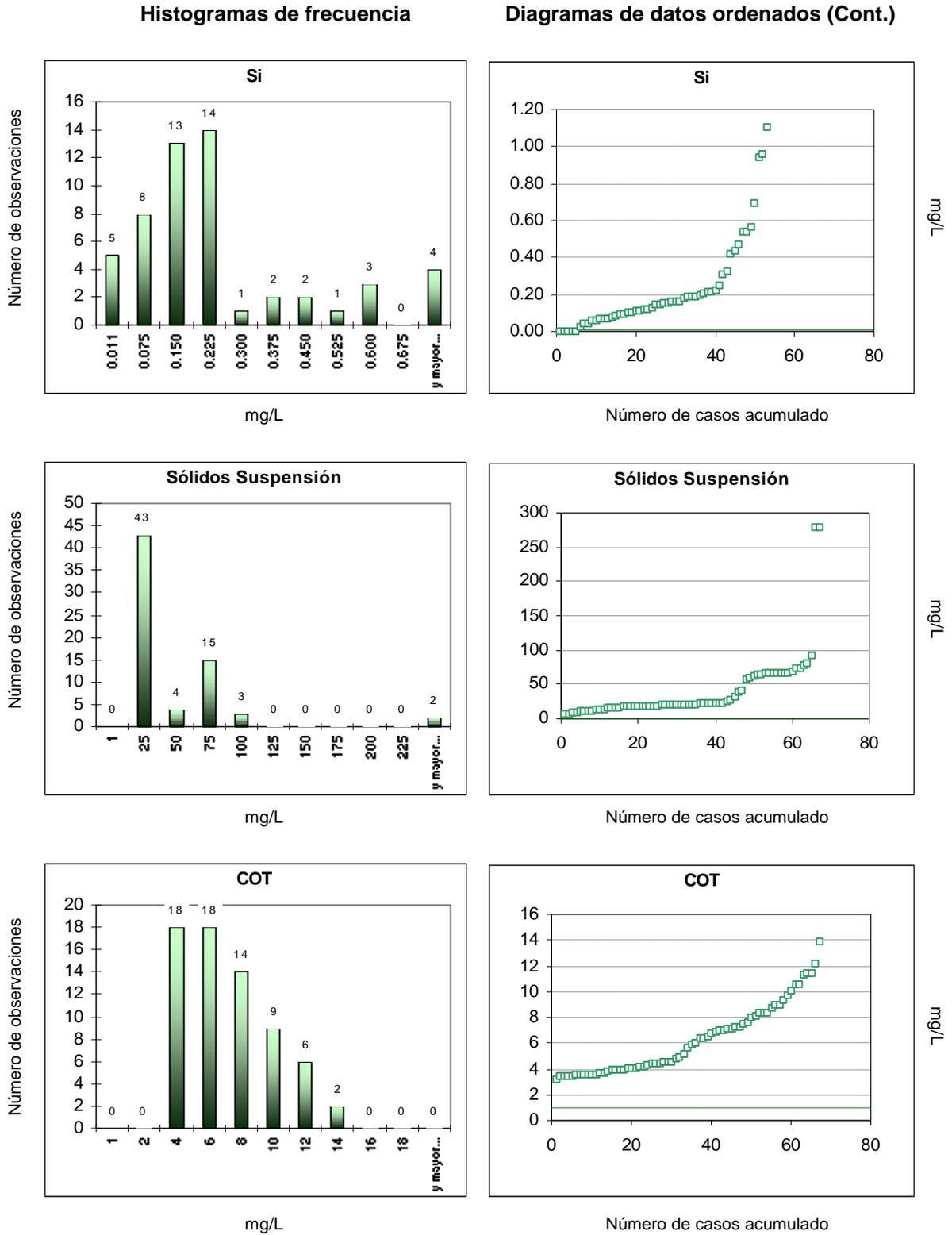


Figura C II.6. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE CÁDIZ

Diagramas de Box-Whisker (Cont.)

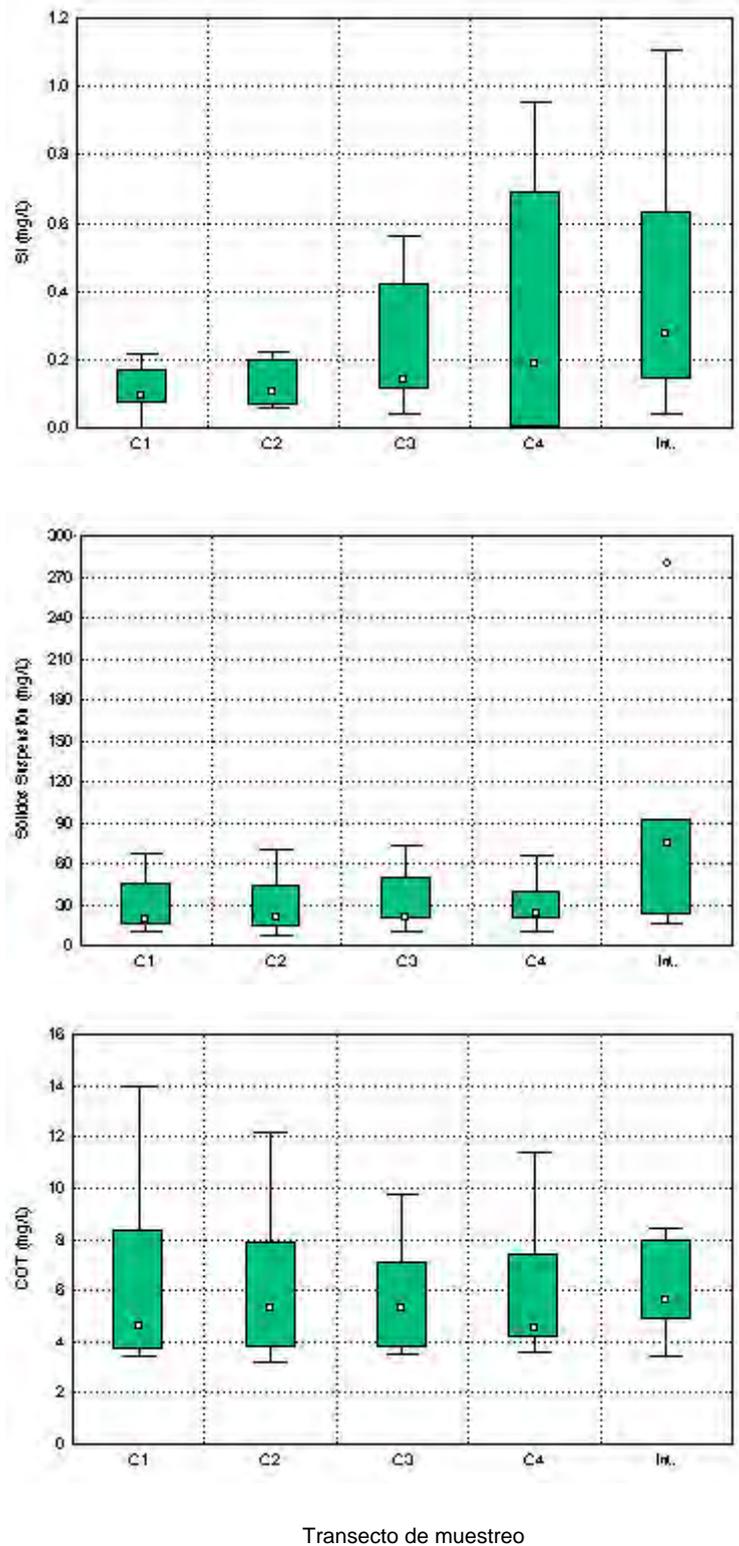


Figura C II.6. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE CÁDIZ

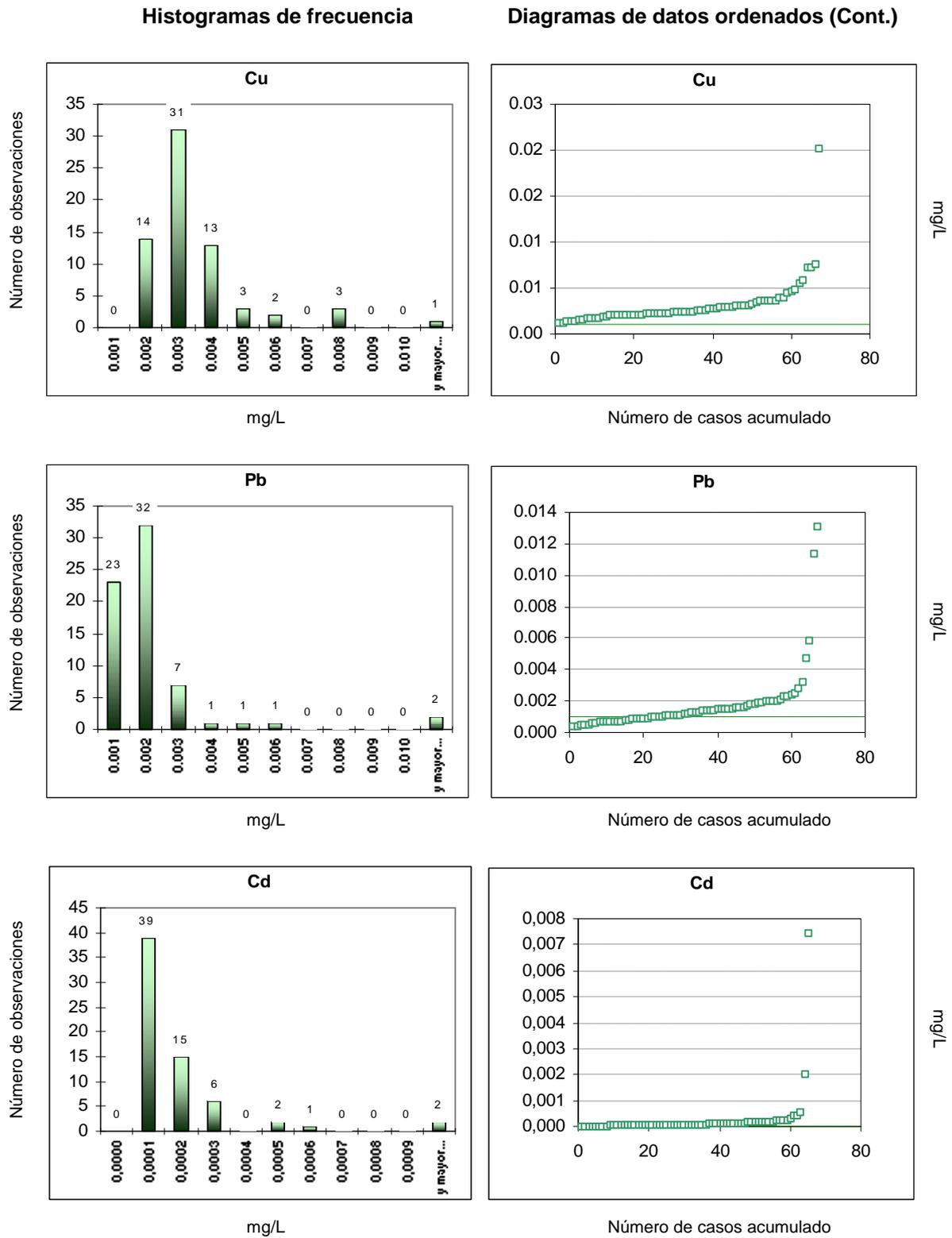


Figura C II.6. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE CÁDIZ

Diagramas de Box-Whisker (Cont.)

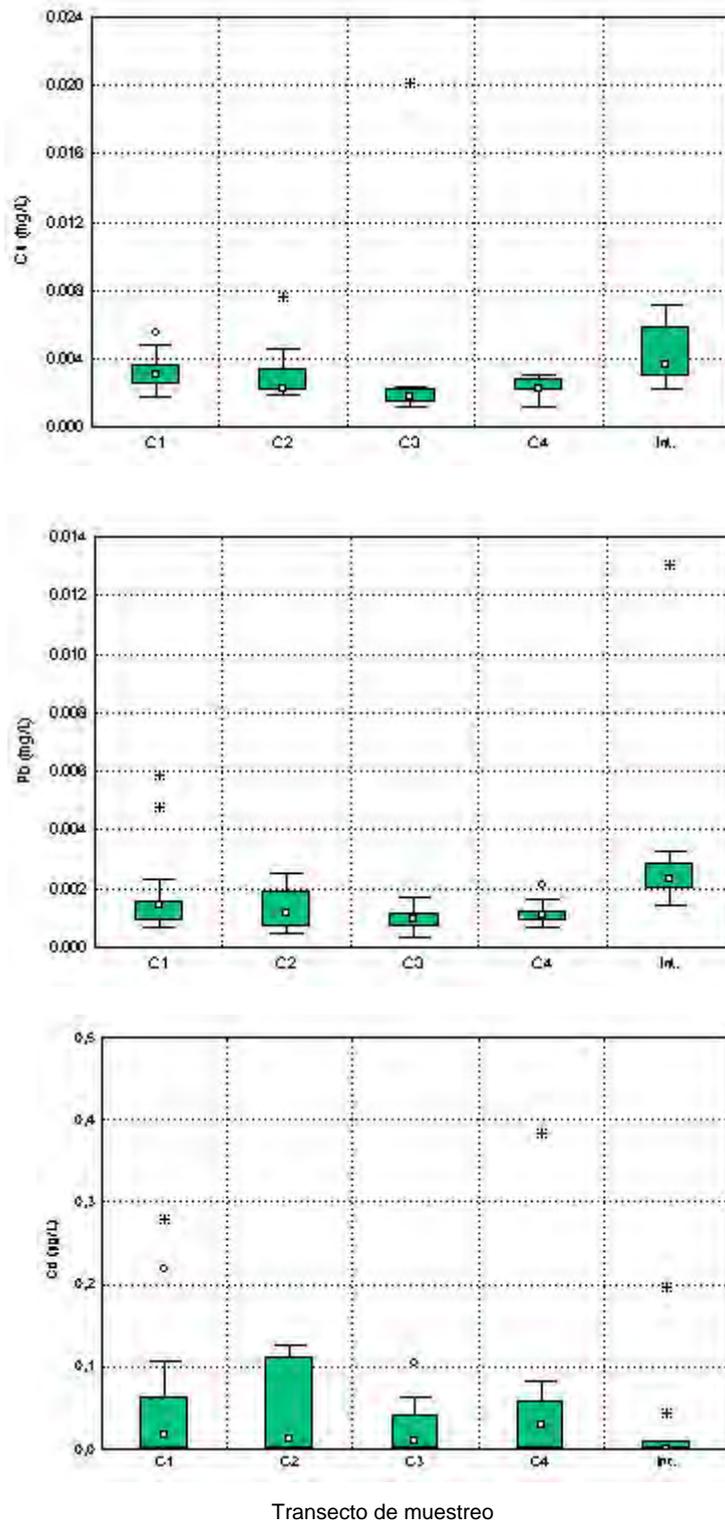


Figura C II.6. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE CÁDIZ

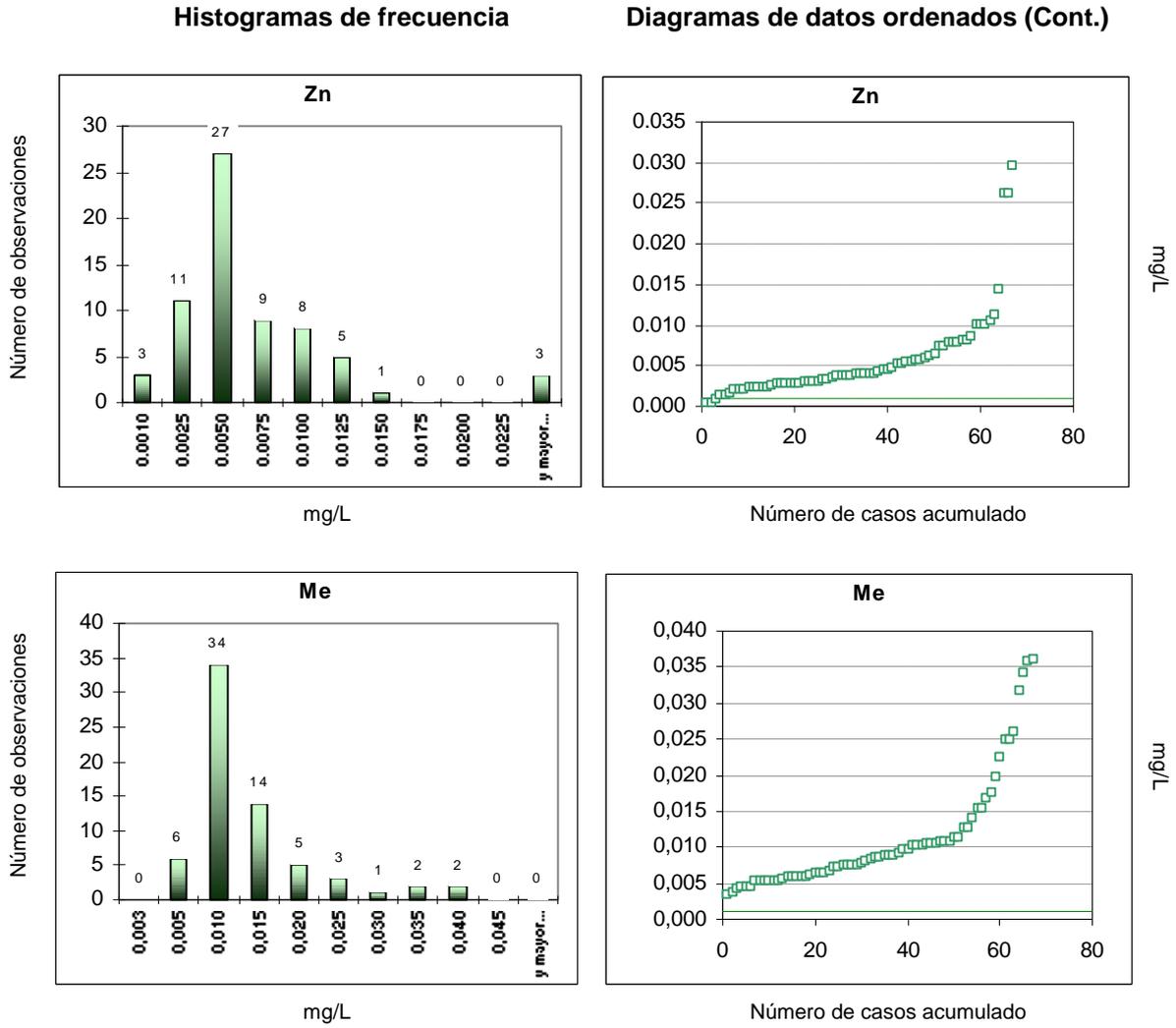


Figura C II.6. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE CÁDIZ

Diagramas de Box-Whisker (Cont.)

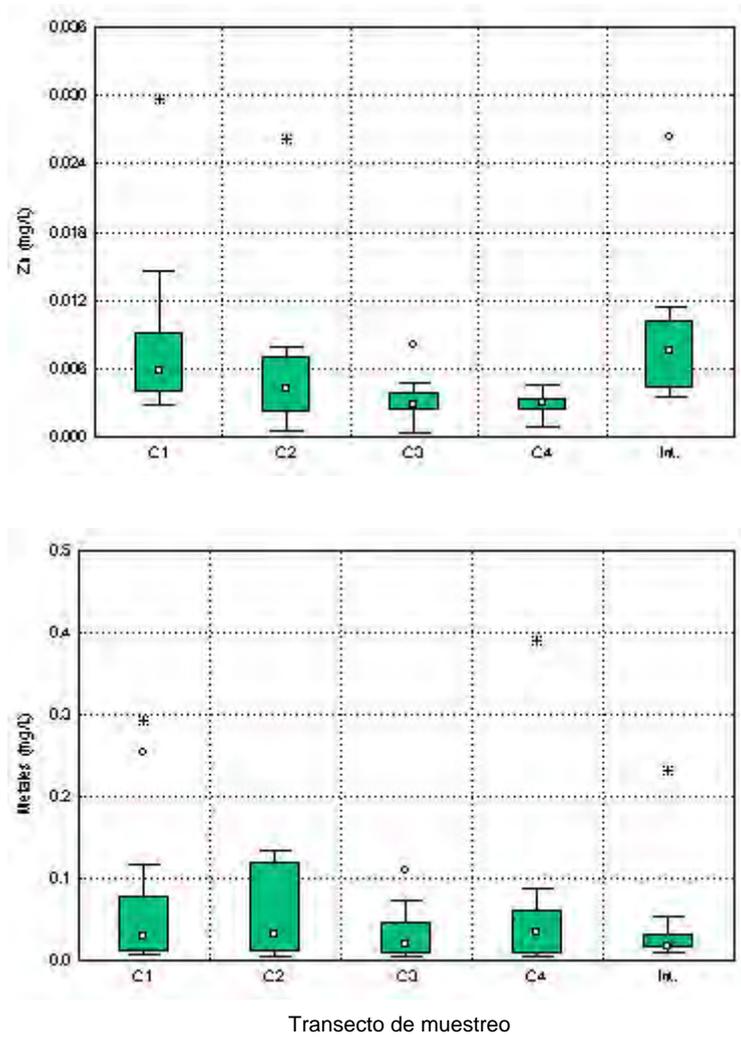


Figura C II.6. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE CÁDIZ

AMONIO

El histograma de frecuencia del parámetro *amonio* se ha construido a partir de un total de 67 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 25 $\mu\text{g/L}$ NH_4^+ . La clase-0 incluye a todas las observaciones inferiores a 13 $\mu\text{g/L}$. La clase-10 incluye todas aquellas observaciones superiores a 225 $\mu\text{g/L}$. Como se puede apreciar gráficamente, 19 casos los cuales representan un 28 % de las observaciones, se han clasificado como no-detectadas. Las cuatro primeras clases (hasta 75 $\mu\text{g/L}$) incluyen el 81 % de los casos. Las concentraciones hasta 175 $\mu\text{g/L}$ incluyen el 96 % de las medidas realizadas.

El diagrama de datos ordenados muestra como se pueden distinguir tres zonas en la nube de puntos identificadas por un cambio brusco de pendiente. Las dos zonas correspondientes a las concentraciones más bajas y presentan pendientes similares, ligeramente superior la segunda. La tercera zona se caracteriza por una pendiente muy acusada. El punto final alcanza un valor de 0,422 mg/L NH_4^+ (0,328 mg/L N-NH_4^+ , Tabla C II.44.). La tercera zona está formada por concentraciones superiores a 150 $\mu\text{g/L}$, localizados en las estaciones interiores de la Bahía de Cádiz según los diagramas de box-whiskers. La segunda zona fundamentalmente está formada por algunos valores medidos en las estaciones interiores y el saco interior de la bahía, y finalmente el primer tramo está identificado con el resto de observaciones inferiores a 50 $\mu\text{g/L}$ y localizadas en los transectos exteriores.

En los diagramas de box-whiskers se observan claramente como existen **grandes diferencias en las concentraciones de amonio de las estaciones interiores y del resto de la Bahía de Cádiz**. Para este parámetro aparecen 4 valores anómalos, uno de ellos en la caja que representa las estaciones interiores, y tres valores anómalos en C1. Si bien en el presente documento sólo se han mostrado los valores promedios de los cuatro muestreos realizados en la Bahía de Cádiz, los resultados por muestreo indican que 2 de estos valores anómalos se corresponden con la estación C1D la cual se sitúa en la zona de influencia de la pluma de vertido de la depuradora "Las Galeras" de El Puerto de Santa María (0,051 y 0,082 mg/L NH_4^+), y el tercero se corresponde con la estación C1A (0,086 mg/L NH_4^+). En esta última estación se observó durante la toma de muestra que, a pesar de ser la estación más alejada o más exterior y por tanto debería considerarse como la más "limpia", el tráfico marítimo que se dirige a varios puertos comerciales y militares de la zona afecta a la calidad de las aguas puesto que se observaron gran cantidad de restos flotantes, zonas con brillo iridiscente (grasas y aceites) y espumas. Los resultados de amonio están acordes con las observaciones visuales.

NITRITOS

El histograma de frecuencias para la representación de *nitritos* se ha construido a partir de 66 casos clasificados en 10 clases de intervalos de 25 $\mu\text{g/L}$ NO_2^- cada una. La clase-0 está definida por una concentración de 7 $\mu\text{g/L}$ NO_2^- la cual es el límite de detección de este método analítico, e incluye 30 casos no-detectados los cuales se corresponden con el 45% de las observaciones. La clase-10 incluye un caso superior a 225 $\mu\text{g/L}$ identificado posteriormente en el diagrama de box-whisker como un valor extremo en el transecto C4. Los resultados muestran que la primera clase incluye el 61% de los resultados, la segunda los primeros 50 $\mu\text{g/L}$ correspondientes al 81 % de los datos, y finalmente, los primeros 100 $\mu\text{g/L}$ incluyen el 97% de los resultados.

En el diagrama de datos ordenados, se observa nuevamente las dos zonas que reflejaba el amonio, esto es una **gran diferencia entre la concentración de nitritos determinada en las estaciones interiores respecto al resto de estaciones de la bahía**. También existen dos valores puntuales más altos que el resto pero en este caso no se distingue un tercer conjunto de valores. El primer grupo está formado por las observaciones menores de 25 $\mu\text{g/L}$ localizadas en su mayoría en los transectos C1 y C2. El segundo grupo identificado se corresponde con observaciones desde 25 hasta 100 $\mu\text{g/L}$ localizadas principalmente en el transecto C3, C4 y C5.

Las representaciones de box-whiskers muestra una tendencia al **incremento de los valores de nitritos** a medida que los transectos se localizan en **zonas más cerradas**. En las estaciones interiores, las concentraciones son notablemente superiores al resto de transectos. Este diagrama identifica varios valores anómalos y un valor extremo en C4 (0,257 mg/L NO₂).

NITRATOS

El histograma de frecuencias de los *nitratos* está formado por clases de 125 µg/L NO₃⁻. La clase-0 incluye los primeros 9 µg/L (13 casos), y la clase-10 aquellas observaciones superiores a 1125 µg/L (3 casos). El histograma muestra como el 57% de las observaciones presentan concentraciones inferiores a 250 µg/L, el 76% presentan menos de 375 µg/L, y el 96% presentan menos de 750 µg/L de NO₃⁻.

Con relación a los diagramas de datos ordenados, los *nitratos* presentan una evolución lineal con pendiente muy suave. La forma lineal de la curva está afectada exclusivamente por algunas observaciones las cuales se han identificado en los diagramas box-whiskers como valores anómalos y extremos en C2 (2,127 mg/L NO₃⁻ en C2C) y en las estaciones interiores (1,486 mg/L NO₃⁻ en C5A y 3,167 mg/L NO₃⁻ en C5E).

Los diagramas de box-whiskers de este parámetro muestran además, como las cajas presentan una distribución muy similar en C1 y C2 y superior a las obtenidas para C3 y C4 sin embargo no se ve un comportamiento claro debido a que las cajas están achatadas por la presencia de los valores anómalos y extremos. Para otros parámetros no es importante, sin embargo en el caso de los nitratos sí lo es debido a que es la especie de nitrógeno mayoritaria en aguas marinas y las concentraciones son de un orden (o dos) de magnitud superior a nitritos y amonio. En caso de que se omitiesen los valores extremos y anómalos se observaría una distribución similar en C1, C2 y Int. e inferior en C3 y C4.

NITRÓGENO

Mediante este parámetro se resume el contenido de nitrógeno disuelto en la Bahía de Cádiz. Realizando el cálculo de los porcentajes de aportación de cada una de las especies de nitrógeno sobre el contenido total se obtiene los siguiente:

| Datos | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | Int. | Bahía de Cádiz |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------|
| Promedio de N-NH ₄ (mg/L) | 0,009 | 0,013 | 0,010 | 0,019 | 0,074 | 0,155 | 0,025 |
| Promedio de N-NO ₂ (mg/L) | 0,002 | 0,003 | 0,003 | 0,003 | 0,011 | 0,022 | 0,004 |
| Promedio de N-NO ₃ (mg/L) | 0,078 | 0,038 | 0,032 | 0,043 | 0,069 | 0,105 | 0,052 |
| ΣN (mg/L) | 0,089 | 0,054 | 0,044 | 0,065 | 0,154 | 0,283 | 0,081 |
| % N-NH ₄ | 10,5 | 24,4 | 22,2 | 29,3 | 47,9 | 54,9 | 30,8 |
| % N-NO ₂ | 1,9 | 4,7 | 5,9 | 5,3 | 7,0 | 7,9 | 5,2 |
| % N-NO ₃ | 87,6 | 70,9 | 71,9 | 65,4 | 45,1 | 37,1 | 64,0 |
| % ΣN | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |

En el caso de la Bahía de Cádiz se observa como los **nitratos es la especie predominante**. Los porcentajes obtenidos en C1, C2 y C3 son superiores al 70%, destacando el que se obtiene en el transecto exterior con un 87,6%. Notar el **bajo porcentaje de nitratos en las estaciones interiores y el alto porcentaje de amonio**.

En función de los porcentajes de nitrógeno podría decirse que las aguas de la **Bahía de Cádiz** se comportan como un **sistema abierto** y que las **estaciones interiores y de aguas limitadas** son las que **muestran eventos de contaminación**, que al ser tan importante en formas de amonio, esta contaminación puede estar debida a aguas residuales urbanas.

El histograma de frecuencias para la representación de *nitrógeno* muestra como existe una gran concentración de casos (64%) en la segunda clase la cual se corresponde con los primeros 100 µg/L. La tercera clase correspondiente a 150 µg/L le corresponde un porcentaje acumulado del 81% de los casos y la clase-7 de 350 µg/L representa el 96% de los casos.

Con relación a la representación de datos ordenados vemos como existe una evolución lineal y de pendiente suave en casi toda la curva similar a la obtenida para los nitratos. Al final de ésta, se curva con una gran pendiente provocada por valores muy altos correspondientes a tres altas concentraciones de nitrógeno en forma de nitratos (ver comentario de éste parámetro), dos de los cuales son identificados como valores extremos en el diagrama de box-whisker.

En los diagramas de box-whiskers se identifican dos valores extremos (en C2 y estaciones interiores) y cinco valores anómalos (dos en C1y en C4 y uno en C3). Estos valores anómalos aparecen por la distribución de valores del transecto pero están muy próximos al cuartil superior.

En relación a la distribución espacial de este parámetro, vemos que las **estaciones interiores presentan una mayor contaminación por nitrógeno que el resto de transectos de la bahía**. En relación a estos transectos, los valores extremos no permiten observar bien la distribución de valores en estos transectos. Si se suprimiesen estos valores se observaría que la distribución de valores es prácticamente homogénea en los cuatro transectos, ligeramente superior en C2 (zona de influencia de la desembocadura del Guadalete).

FOSFATOS

El histograma de frecuencia del parámetro *fosfatos* ha tenido que construirse en intervalos de clase diferentes a los realizados para la Ría de Huelva debido a que la Bahía de Cádiz presenta un contenido de fosfatos muy inferior en la bahía incluso en las aguas interiores. En este caso, los intervalos de clase han sido de 10 µg/L comenzando en la clase-1 con 40 µg/L puesto que la clase-0 incluye todos los valores no detectados y por lo tanto, por debajo de 30 µg/L. En esta clase-0 vemos como existe un gran número de casos no-detectados (40%). La primera clase es la que incluye un mayor número de casos detectados (70%) y el 94 % de los casos se encuentran por debajo de los 120 µg/L de PO₄³⁻.

El diagrama de datos ordenados muestra dos zonas, una primera de tendencia lineal y pendiente suave hasta un valor de 50 µg/L, y una segunda zona de gran pendiente. Observando el gráfico de box-whisker se comprueba que esta segunda zona está formada por valores exclusivamente localizados en las estaciones interiores.

Respecto al resto de transectos, vemos como los transectos C1, C2 y C3 presentan los mismos niveles de fosfatos en la bahía, el transecto C4 tiene valores ligeramente superiores y las **estaciones interiores muestran altas concentraciones de fosfatos**.

FÓSFORO

El histograma de frecuencia del parámetro *fósforo total* se ha construido a partir de un total de 67 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 50 µg/L P (la mitad que en la Ría de Huelva). Para este parámetro no se han obtenido valores no detectados. El 67% de los casos presentan concentraciones inferiores a 100 µg/L. Por debajo de 150 µg/L se concentra el 75 % de los casos y por debajo de 300 µg/L se incluye el 97%.

El diagrama de datos ordenados muestra aproximadamente la misma forma que los fosfatos, esto es, una primera zona de evolución lineal de los valores y pendiente suave hasta 100 µg/L, y un aumento brusco en las concentraciones hasta valores de 350 µg/L. En este caso, esta segunda zona se distribuye entre valores localizados en todos los transectos, C1 y C2 en el primer tramo de la segunda zona, C3 y C4 en la zona central y las mayores concentraciones medidas en C4 y C5. Especialmente, este parámetro

umenta a medida que las estaciones de muestreo y los transectos se localizan en aguas más interiores.

SILICATOS

El histograma de frecuencia del parámetro *silicatos* se ha construido a partir de un total de 53 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 75 µg/L Si. Se obtienen 5 casos no detectados, es decir, de concentración inferior a 30 µg/L Si. El histograma de silicatos muestra una gran concentración de observaciones en las cuatro primeras clases correspondientes a los primeros 225 µg/L. El 49% de las observaciones se centran en los primeros 150 µg/L, el 75% en los primeros 225 µg/L y el 92% en los primeros 600 µg/L.

El diagrama de datos ordenados muestra nuevamente una diferenciación de la nube de puntos en dos tramos, el primero hasta concentraciones de 250 µg/L y el segundo hasta unos 1100 µg/L. Al primer grupo contribuyen todos los transectos de muestreo sin embargo al grupo de mayores concentraciones, sólo contribuyen los transectos C3 y C4 y las estaciones interiores.

SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN

Para este parámetros tenemos 67 casos divididos en diez clases de 25 mg/L cada una excepto la primera, la cual no presenta ningún caso no detectado. Tanto en el histograma de frecuencias como en el diagrama de datos ordenados se observa como existen dos grupos de valores, un grupo que se corresponden con un conjunto de valores bajos inferiores a 50 µg/L y un segundo grupo de valores altos entre 50 y 100 mg/L. Existen dos casos identificados como anómalos en las estaciones interiores ambos de 280 mg/L de sólidos en suspensión localizadas en la estación C5F.

Especialmente el diagrama de box-whisker muestra como los transectos exteriores de la bahía presentan niveles de sólidos en suspensión similares, el transecto C3 intermedia, y C4 e interiores muy altas.

COT

Para este parámetro se han establecido clases de 2 mg/L C exceptuando la primera de 1 mg/L que representa el límite de detección. Las dos primeras clases no incluyen ningún valor. En términos de porcentaje la clase-3 de 6 mg/L incluye el 54% de los casos, la clase-4 de 8 mg/L incluye el 75% y la clase-6 de 12 mg/L incluye el 97% de los casos. Este parámetro presenta también los dos grupos de medida pero de forma más enmascarada que el resto de parámetros.

El diagrama de box-whisker muestra niveles parecidos en todos los transectos, localizando la mayor parte del área de las cajas entre 4 y 8 mg/L COT

COBRE

El histograma de frecuencia del parámetro *cobre* se ha construido a partir de un total de 67 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 1 µg/L Cu. Estos intervalos son un orden de magnitud inferiores a los fijados para los transectos de Huelva.

Tanto en el histograma de frecuencias como en el de datos ordenados se observa una distribución muy simétrica de los resultados con sólo unas cinco o seis observaciones que distorsionan la zona de concentraciones más altas. Un 67% de las observaciones se incluyen en los 3 primeros µg/L, y el 94% es inferior a 7 µg/L.

Entre los valores más altos tenemos dos valores localizados en estaciones interiores (C5A y C5F) y un valor en C2C (área de influencia de la salida del Guadalete) y el valor más alto de cobre (0,0201 mg/L Cu)

localizado en C3C. Este último punto está muy próximo a la factoría de Astilleros en la localidad de Puerto Real.

El diagrama de box-whisker identifica el valor de C3C y de C2C como valores extremos. En C1 existe un valor anómalo localizado en C1A. Se debe recordar que ésta es la estación más exterior del sistema.

En relación a la variabilidad espacial, los cuatro transectos presentan valores similares y las **estaciones interiores presentan concentraciones superiores**.

En relación a este parámetro, aunque se ha realizado el análisis hay que tener en cuenta los niveles tan bajos de cobre medidos en la bahía.

PLOMO

El histograma de frecuencia del parámetro *plomo* se ha construido a partir de un total de 67 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 1 µg/L Pb. El rango de intervalo se ha bajado un poco con respecto al seleccionado para Huelva. Por debajo del límite de detección de 0,001 mg/L se sitúan el 34% de las muestras. El 82% de los casos se concentran en los 2 µg/L y el 96% en los 5 µg/L.

La forma del histograma así como la del diagrama de datos ordenados muestran una variación simétrica afectado exclusivamente por varios casos que presentan muy altas concentraciones respecto a la gran mayoría de concentraciones. Los cuatro valores superiores se localizan por orden en C5F (0,0131 mg/L), C5C (0,0114 mg/L), 0,0059 (C1D) y 0,0048 (C1A).

Espacialmente no existe mucha diferencia entre transectos, sólo en **estaciones interiores** en las cuales **umenta ligeramente las concentraciones**.

Al igual que el cobre, este metal se encuentra en cantidades muy pequeñas en la Bahía de Cádiz.

CADMIO

Para el cadmio, ha sido necesario disminuir las concentraciones de cada clase puesto que este metal está presente en menores concentraciones en la Bahía de Cádiz respecto a la Ría de Huelva. Así, el histograma de frecuencia del parámetro *cadmio* se ha construido a partir de un total de 67 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 0,1 µg/L Cd. El 83% de los valores se concentran en las dos primeras clases incluyendo la que muestra los valores no detectados (para este parámetro todas las observaciones se detectaron), por tanto, el 83% de los valores son inferior o igual a 0,1 µg/L. El 95% es inferior a 0,3 µg/L.

El diagrama de datos ordenados presenta dos partes, una primera de pendiente nula formada por todas las observaciones inferiores a 0,3 µg/L, y una segunda parte formado por dos valores altos correspondiente a las estaciones C3A (7,47 µg/L) y C1D (2,03 µg/L). Hay que recordar que el punto C3A se localiza muy próximo a uno de los muelles de una factoría naval, y C1D se corresponde con la zona de influencia de la pluma del efluente de la EDAR "Las Galeras" de El Puerto de Santa María.

El diagrama de box-whisker identifica varios valores extremos y valores anómalos. Para este parámetro, curiosamente las estaciones que presentan menor concentración son las interiores.

ZINC

El rango de concentraciones para el zinc ha habido que bajarlo en relación con los fijados para Huelva. El histograma se ha construido a partir de un total de 67 casos divididos en 10 clases principales de

intervalos de concentración de 2,5 $\mu\text{g/L}$ Zn con una clase inicial de 0,001 $\mu\text{g/L}$ representando las observaciones no detectadas que en este caso han sido 3. El 61% de los casos se concentra en la clase-2 de 5 $\mu\text{g/L}$, con la clase-3 se concentran el 75% de los casos (1 $\mu\text{g/L}$), y el 96% de los resultados se encuentran por debajo de los 1,75 $\mu\text{g/L}$.

El diagrama de datos ordenados muestra una simetría en la evolución de los valores. Sólo está distorsionada en cuatro o cinco observaciones localizadas en C1A (0,0296 mg/L), C5F (0,0263), C2C (0,0146) y C1A (0,0146 mg/L). Notar que la estación más exterior C1A, presenta dos de las cuatro concentraciones más altas de la bahía en relación al parámetro zinc.

El diagrama de box-whisker muestra como existe un descenso en la concentración de zinc en los transectos más interiores C3 y C4. En C1, C2 y estaciones interiores, los niveles son parecidos.

METALES

Finalmente, para este parámetro se ha realizado el histograma a partir de 67 casos divididos en 10 clases de 0,005 mg/L. La clase-0 se corresponde con el límite de detección el cual se ha fijado en 0,003 mg/L. Para esta clase, no existe ningún caso. Para el resto de clases, tenemos el 60% de los casos localizados en los primeros 10 $\mu\text{g/L}$, el 81% en los primeros 20 $\mu\text{g/L}$, y el 97% en los primeros 40 $\mu\text{g/L}$.

La forma que toma el diagrama de datos ordenados es una mezcla de los diagramas de los metales individuales, fundamentalmente, del cobre, plomo y cadmio. La forma resultante se ajusta perfectamente a una distribución lognormal de los resultados.

4.2.4. MATRIZ DE CORRELACIÓN. ANÁLISIS CLUSTER. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.

Mediante el paquete informático Statistica 6.0 (StatSoft Inc. 1997) se ha computado la matriz de correlación de las variables estudiadas en la Bahía de Cádiz además de un análisis cluster y el análisis de componentes principales y análisis factorial de las variables.

Además, se ha realizado el cluster de las estaciones de muestreo con objeto de clasificar las estaciones de muestreo en función de la calidad de las aguas.

4.2.4.1. MATRIZ DE CORRELACIÓN

Se ha realizado la *matriz de correlación* de Pearson de las variables físico-químicas más estudiadas en la Bahía de Cádiz. Para esta área ambiental el número de casos computados ha sido N=53. Al igual que se realizó en la Ría de Huelva, se ha representado en color azul oscuro las correlaciones positivas y en color rojo oscuro las correlaciones negativas. También se incluye las representaciones de la dispersión de cada par de variables, se han incluido las representaciones de éstas.

Tabla C II.46. Matriz de correlaciones de las variables en la Bahía de Cádiz

| | pH | T | S | NH ₄ | NO ₂ | NO ₃ | SN | PO ₄ | P | Si | SS | SV | TC | IC | COT | Cu | Pb | Cd | Zn | SMe | |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|--------------|--------------|-------|-------------|-------------|-------------|-------------|------|------|--|
| pH | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| T | -0,25 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S | 0,03 | -0,50 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NH ₄ | -0,47 | 0,28 | -0,26 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NO ₂ | -0,19 | 0,13 | 0,18 | 0,24 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NO ₃ | -0,30 | 0,07 | -0,17 | 0,64 | -0,01 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| SN | -0,40 | 0,16 | -0,20 | 0,83 | 0,15 | 0,96 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | |
| PO ₄ | -0,32 | -0,02 | 0,18 | 0,57 | 0,46 | 0,11 | 0,31 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | |
| P | -0,20 | -0,15 | 0,06 | 0,49 | 0,33 | 0,12 | 0,28 | 0,69 | 1,00 | | | | | | | | | | | | |
| Si | -0,17 | 0,26 | 0,01 | 0,38 | 0,13 | -0,03 | 0,12 | 0,24 | 0,39 | 1,00 | | | | | | | | | | | |
| SS | -0,12 | 0,32 | 0,01 | 0,33 | 0,07 | -0,07 | 0,07 | 0,07 | 0,12 | 0,65 | 1,00 | | | | | | | | | | |
| SV | -0,33 | 0,82 | -0,28 | 0,41 | 0,21 | 0,01 | 0,16 | 0,17 | 0,04 | 0,53 | 0,65 | 1,00 | | | | | | | | | |
| TC | 0,31 | -0,74 | 0,38 | -0,20 | -0,20 | -0,08 | -0,15 | -0,16 | 0,07 | -0,05 | 0,15 | -0,65 | 1,00 | | | | | | | | |
| IC | -0,47 | 0,52 | -0,12 | 0,51 | 0,32 | 0,16 | 0,32 | 0,41 | 0,33 | 0,36 | 0,31 | 0,55 | -0,41 | 1,00 | | | | | | | |
| COT | -0,04 | 0,37 | -0,44 | 0,05 | -0,09 | -0,18 | -0,12 | -0,12 | 0,02 | 0,56 | 0,43 | 0,43 | -0,13 | 0,12 | 1,00 | | | | | | |
| Cu | -0,06 | -0,12 | 0,07 | 0,19 | -0,01 | 0,29 | 0,28 | 0,07 | 0,04 | -0,11 | -0,11 | -0,15 | 0,08 | -0,02 | -0,15 | 1,00 | | | | | |
| Pb | -0,24 | -0,01 | 0,22 | 0,26 | 0,14 | 0,05 | 0,14 | 0,36 | 0,19 | 0,02 | 0,17 | 0,07 | 0,07 | 0,05 | -0,12 | 0,24 | 1,00 | | | | |
| Cd | 0,02 | 0,13 | -0,31 | -0,08 | -0,15 | -0,16 | -0,16 | -0,25 | -0,05 | 0,40 | 0,24 | 0,18 | 0,01 | -0,21 | 0,68 | -0,07 | 0,19 | 1,00 | | | |
| Zn | -0,17 | -0,22 | 0,29 | 0,08 | -0,01 | 0,48 | 0,38 | 0,06 | 0,15 | -0,16 | -0,23 | -0,32 | 0,19 | -0,11 | -0,21 | 0,33 | 0,44 | -0,02 | 1,00 | | |
| SMe | -0,02 | 0,10 | -0,25 | -0,04 | -0,14 | -0,08 | -0,08 | -0,21 | -0,01 | 0,36 | 0,21 | 0,13 | 0,04 | -0,21 | 0,62 | 0,06 | 0,32 | 0,98 | 0,14 | 1,00 | |

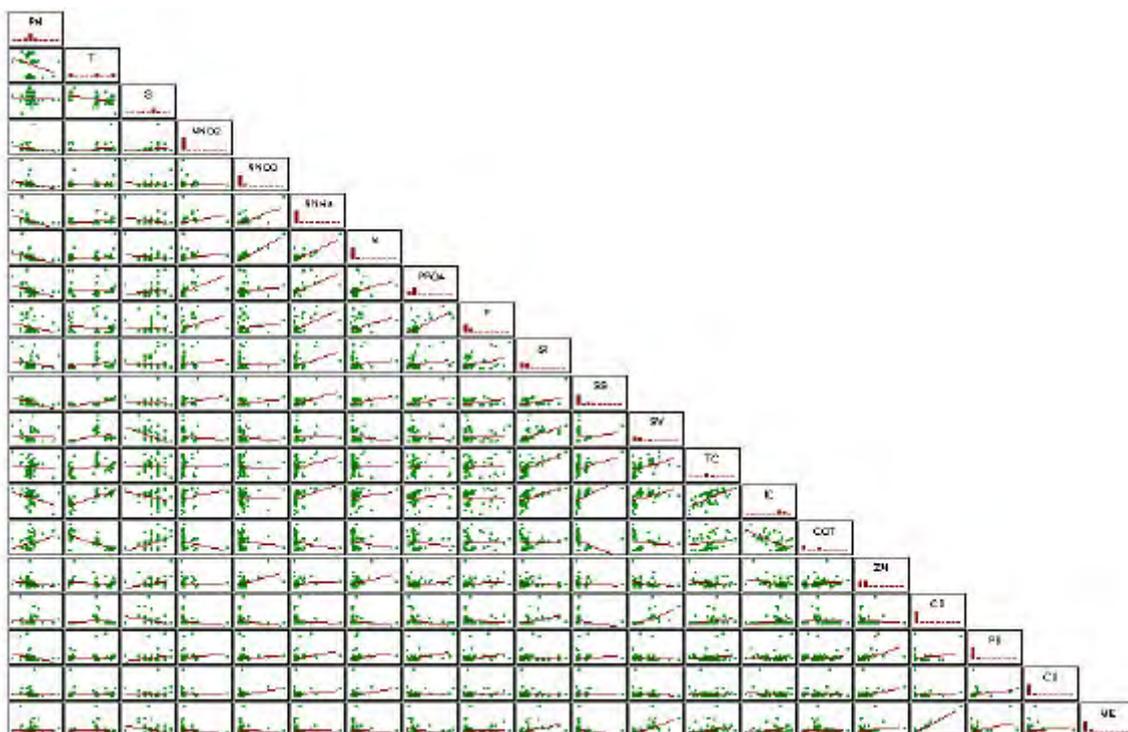


Figura C II.7. Matriz de diagramas de dispersión de las variables de estudio en la Bahía de Cádiz

Mientras que en la Ría de Huelva la cantidad de correlaciones era alta y la proporción de correlaciones positivas y negativas estaba proporcionada, en la Bahía de Cádiz vemos como el número de correlaciones es inferior y predominan las correlaciones positivas. De estas, caben destacar las siguientes:

De las correlaciones positivas cabe destacar las siguientes:

Nutrientes: vemos como existe un grupo de parámetros relativos a formas de nitrógeno, fósforo y sílice que presentan correlaciones positivas entre si

- El amonio se correlaciona positivamente con los nitratos, fosfatos, fósforo total y sílice.
- Los nitritos además se correlacionan con los fosfatos y el fósforo total.
- Los nitratos se correlacionan con el fósforo total.
- Los fosfatos se correlacionan con el fósforo total.

Metales: las correlaciones que existen son del zinc con el cobre y el plomo.

- El cobre y el zinc también se correlaciona con los nitratos.

Otros parámetros: otras correlaciones positivas muy significativas son las siguientes:

- Sólidos en suspensión y sólidos volátiles.
- Carbono orgánico y los sólidos.

Entre las correlaciones negativas cabe destacar la siguiente:

Nutrientes: el amonio, los nitratos y los fosfatos se correlacionan negativamente con el pH.

Muchas de las correlaciones aquí señaladas coinciden con las obtenidas en la Ría de Huelva, como por ejemplo las correlaciones entre nutrientes, las correlaciones entre los sólidos o entre algunos metales. En el caso de la Bahía de Cádiz estas correlaciones son menos potentes que las obtenidas en Huelva. Para ilustrarlo con un ejemplo veamos el caso de los nitritos. Ya se ha comentado con anterioridad que el nitrito es una especie inestable en agua, proviene de formas reducidas de nitrógeno (amonio) que en presencia de oxígeno en las aguas se oxida a nitritos y rápidamente a nitratos. En la Bahía de Cádiz, los niveles de amonio y nitritos son inferiores a los de Huelva, y por tanto los niveles de nitritos medidos serán inferiores. Cuando se opera con niveles pequeños puede ocurrir que algunas interacciones entre parámetros no se perciban significativas. En el caso de la Ría de Huelva, se encontró una correlación positiva entre los niveles de amonio, nitritos y nitratos. En el caso de la Bahía de Cádiz, existen correlaciones entre los niveles de amonio y nitratos pero no ha resultado significativa la correlación con nitritos quedándose en el umbral de significancia.

4.2.4.2. ANÁLISIS CLUSTER EN LA BAHÍA DE CÁDIZ

En relación con el *análisis cluster* en la Bahía de Cádiz, se han representado dos tipos de cluster:

- i. *Cluster de variables*, en el cual se realiza una clasificación de las variables de estudio. Se incluyen dos dendogramas, el primero en el cual se incluyen todas las variables (17 variables fisicoquímicas y 53 casos computados), y un segundo dendograma en el cual sólo se incluyen variables relativas a nutrientes (7 variables fisicoquímicas y 53 casos computados).
- ii. *Cluster de casos*, en el cual se realiza una clasificación de las estaciones de muestreo según la similitud de la calidad de sus aguas (17 variables fisicoquímicas 18 estaciones de muestreo). También se incluyen dos dendogramas diferentes: el primero computado con 17 variables

fisicoquímicas, y un segundo dendograma computados sólo con las variables relativas a nutrientes.

Las 17 variables fisicoquímicas fueron: pH, temperatura, salinidad, nitritos, nitratos, amonio, fosfatos, fósforo total, silicatos, carbono total disuelto, carbono orgánico disuelto, sólidos en suspensión y sólidos volátiles, cadmio, plomo, cobre y zinc.

Las 7 variables relativas a nutrientes son: nitritos, nitratos, amonio, fosfatos, fósforo total, silicatos y carbono total disuelto.

Estos análisis se han realizado a partir de los valores estandarizados de las variables transformadas logarítmicamente ($\log(x+1)$, siendo x el valor de la variable), utilizando como distancias métricas las distancias euclídeas, y como regla de amalgamación el método descrito por Ward siguiendo las recomendaciones de diversos autores (ver apartado de introducción a estos análisis en el presente capítulo).

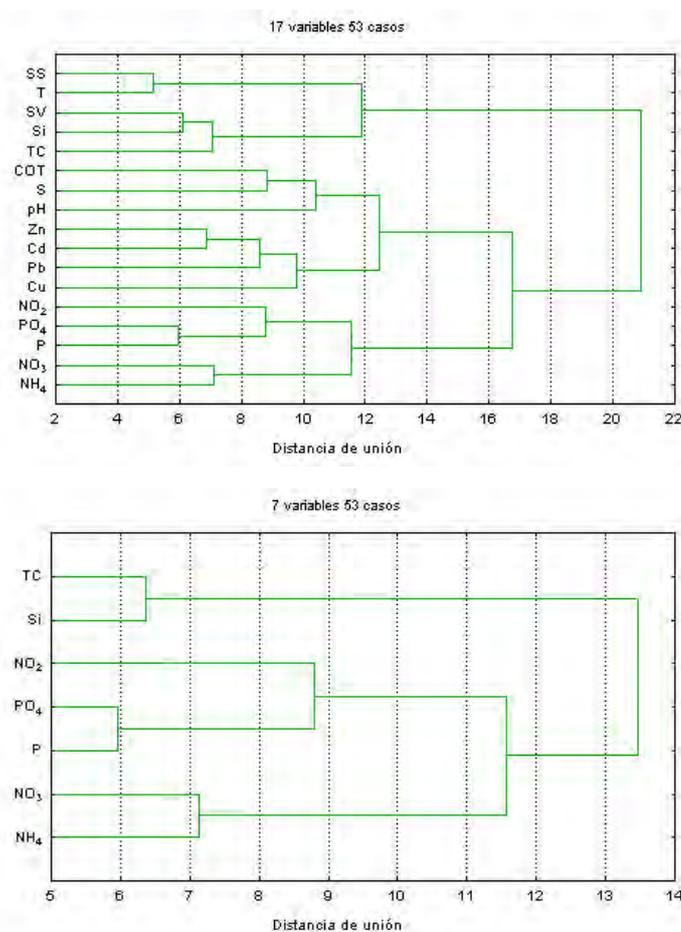


Figura C II.8. Dendogramas obtenidos del análisis cluster en la Bahía de Cádiz

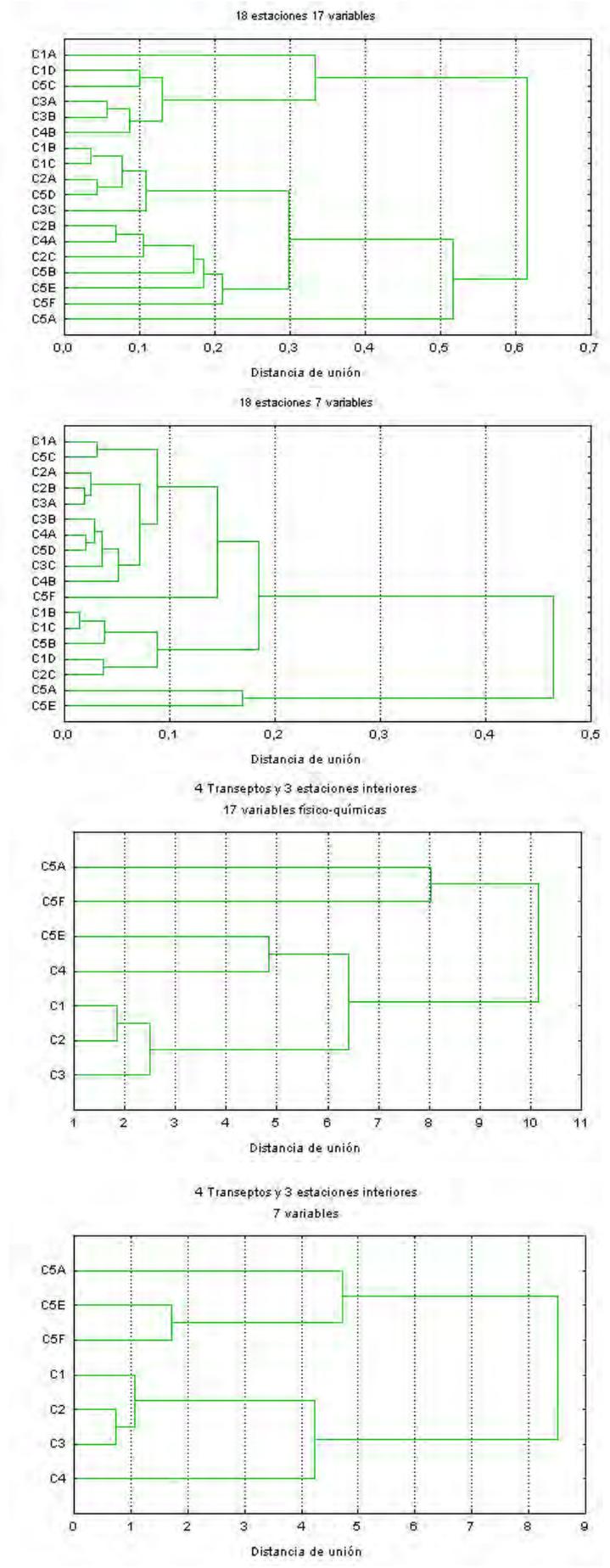


Figura C II.8. Dendrogramas obtenidos del análisis cluster en la Bahía de Cádiz (cont.)

Gran número de las correlaciones obtenidas en el apartado anterior se reflejan en los dendogramas como primeras asociaciones (nitratos-amonio, fosfatos-fósforo, etc.).

Dendograma de 17 variables.

En el dendograma de 17 variables se observan varios grupos pero los más interesantes son las dos grandes asociaciones que se producen en la parte inferior de la representación:

- Asociaciones entre los nutrientes (amonio, nitratos, nitritos, fosfatos y fósforo).
- Asociaciones de metales (cobre, plomo, cadmio y zinc) Las primeras asociaciones que se producen son las siguientes:

Con menor representatividad también se observa:

- Asociaciones entre pH y S.
- En otros grupo más aislado se encuentran los sólidos en suspensión y los sólidos volátiles junto con la temperatura el sílice y el carbono total.

Dendograma de 7 variables.

Las asociaciones que se producen son las siguientes y se corresponden con correlaciones lineales mostradas en la matriz de Pearson:

- Nitratos y amonio.
- Nitritos, fosfatos y fósforo.
- Carbono total y sílice.

El grupo que se forma con segundas asociaciones agrupa todas las formas de nitrógeno y fósforo en un único grupo de parámetros.

Dendograma de estaciones y transectos

En los dendogramas de estaciones y en los de transectos, las agrupaciones se realizan por similitud en la composición del agua.

Al igual que ocurría con Huelva, el gran número de estaciones seleccionadas hace muy difícil encontrar tendencias o grupos de estaciones de composición parecida. Los dendogramas de transectos son más útiles a la hora de realizar una zonificación de la Bahía de Cádiz. Para su realización se han incluido además tres estaciones interiores (C5A, Desembocadura del río Guadalete; C5E, factoría de La Carraca; C5F, Caño Sancti Petri –Puente Zuazo-).

Así, el dendograma que agrupa los transectos de la bahía a partir de 17 variables realiza la siguiente zonificación:

- C5A y C5F.
- C5E y C4.
- C1, C2 y C3.

La segunda asociación importante se realiza entre los transectos de la bahía y la estación C5E.

El dendograma construido sólo con los resultados de nutrientes realiza la siguiente zonificación por similitud en la composición de las aguas:

- C5E y C5F y posteriormente con C5A.
- C1, C2 y C3.

C4 se une en una segunda asociación con el grupo formado por los transectos C1, C2 y C3.

Resumiendo los resultados, se obtienen claramente dos zonas diferenciadas las cuales se pueden ampliar a tres. Una **primera zona** formada por el **saco exterior de la bahía y el límite con el saco interior** (estrecho de Puntales), una **segunda zona** formada por el **saco interior de la bahía** incluyendo la estación de C5E de La Carraca, y una **tercer zona** formada por las **aguas interiores**. La estación C5E podría incluirse dentro de este último grupo.

En los diagramas de box-whisker de algunos parámetros se ha observado la misma variabilidad espacial encontrada en estos dendogramas. Por tanto, se corroboran y complementan las conclusiones obtenidas en los diagramas de box-whisker.

4.2.4.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE LA BAHÍA DE CÁDIZ

Al igual que para el análisis cluster, para la realización del PCA/FA se ha operado con las variables transformadas logarítmicamente y estandarizadas. Tras un análisis previo de componentes principales se ha realizado una rotación varimax de los factores iniciales.

Se ha realizado el análisis factorial de variables físico químicas incluyendo a su vez dos análisis: un análisis de todo el conjunto de variables físico-químicas (20 variables en total) y un análisis de aquellas variables referentes a nutrientes mayoritarios (C, N, P y Si, 10 variables en total).

Las 20 variables fisicoquímicas fueron: pH, temperatura, salinidad, nitritos, nitratos, amonio, nitrógeno disuelto, fosfatos, fósforo total, silicatos, carbono total disuelto, carbono inorgánico, carbono orgánico disuelto, sólidos en suspensión y sólidos volátiles, cadmio, plomo, cobre, zinc y suma de metales.

Las 10 variables relativas a nutrientes son: nitritos, nitratos, amonio, nitrógeno disuelto, fosfatos, fósforo total, silicatos, carbono total, carbono inorgánico y carbono orgánico disuelto.

Las siguientes tablas muestran el número de autovalores/autovectores obtenidos en cada uno de estos análisis así como la varianza explicada por cada uno de los factores, y la varianza total explicada. El número total de autovalores/autovectores utilizados en el PCA/FA se ha seleccionado siguiendo el criterio de algunos autores los cuales consideran todos aquellos autovalores/autovectores de valor mayor a 1.

Así pues, para 20 variables vemos como se obtienen 6 autovalores los cuales explican el 77,8% de la varianza total. En el análisis de 10 variables se obtienen 4 autovalores los cuales explican el 86,1% de la varianza total. Estos porcentajes son bastante altos y por tanto, este análisis explica bastante bien, la varianza del conjunto de datos en la Bahía de Cádiz.

ANÁLISIS DE 20 VARIABLES

Las siguientes tablas muestran un resumen de los resultados obtenidos en el análisis de 20 variables.

Tabla C II.47. Análisis factorial para 20 variables

| <i>Factor</i> | <i>Autovalores</i> | <i>% Varianza total</i> | <i>Autovalores acumulados</i> | <i>% Varianza acumulado</i> |
|---------------|--------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 4,837 | 24,186 | 4,837 | 24,186 |
| 2 | 3,934 | 19,669 | 8,771 | 43,855 |
| 3 | 2,211 | 11,056 | 10,982 | 54,911 |
| 4 | 1,867 | 9,336 | 12,849 | 64,247 |
| 5 | 1,470 | 7,351 | 14,320 | 71,598 |
| 6 | 1,247 | 6,236 | 15,567 | 77,834 |

Tabla C II.48. Factores obtenidos para 20 variables

| | Factor 1 | Factor 2 | Factor 3 | Factor 4 | Factor 5 | Factor 6 |
|--------------------|---------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| Sólidos Suspensión | 0,516 | 0,228 | 0,255 | 0,453 | -0,055 | 0,172 |
| Sólidos volátiles | 0,231 | -0,020 | 0,692 | -0,252 | -0,172 | -0,117 |
| Carbono total | 0,115 | -0,024 | 0,882 | 0,064 | 0,049 | -0,030 |
| Carbono inorgánico | 0,775 | 0,040 | 0,539 | 0,119 | -0,058 | 0,046 |
| Carbono orgánico | -0,893 | -0,076 | 0,178 | -0,090 | 0,125 | -0,089 |
| Nitritos | 0,255 | -0,060 | -0,078 | 0,711 | 0,071 | -0,064 |
| Nitratos | 0,014 | 0,923 | -0,113 | -0,046 | 0,193 | 0,073 |
| Amonio | 0,205 | 0,764 | 0,297 | 0,412 | 0,066 | 0,104 |
| Nitrógeno disuelto | 0,100 | 0,936 | 0,012 | 0,162 | 0,170 | 0,085 |
| Fosfatos | 0,051 | 0,185 | 0,061 | 0,860 | 0,116 | 0,092 |
| Fósforo | -0,215 | 0,280 | 0,236 | 0,731 | -0,007 | 0,039 |
| Silicatos | 0,073 | 0,081 | 0,839 | 0,248 | -0,078 | -0,016 |
| PH | -0,297 | -0,269 | -0,134 | -0,213 | -0,128 | -0,752 |
| Temperatura | 0,910 | 0,094 | 0,242 | -0,088 | -0,060 | -0,008 |
| Salinidad | -0,437 | -0,401 | -0,069 | 0,344 | 0,386 | 0,120 |
| Zinc | -0,226 | 0,304 | -0,180 | -0,042 | 0,741 | 0,133 |
| Cadmio | 0,057 | -0,048 | 0,151 | 0,035 | 0,115 | -0,906 |
| Plomo | 0,050 | -0,059 | 0,138 | 0,225 | 0,782 | 0,162 |
| Cobre | -0,055 | 0,292 | -0,133 | -0,073 | 0,560 | -0,011 |
| S Metales | -0,114 | 0,249 | -0,055 | 0,032 | 0,925 | -0,210 |
| Expl.Var | 3,083 | 2,982 | 2,693 | 2,567 | 2,662 | 1,580 |
| Prp.Totl | 0,154 | 0,149 | 0,135 | 0,128 | 0,133 | 0,079 |

De los seis autovalores obtenidos se comprueba como los cuatro primeros son de gran importancia contribuyendo al 64,3% de las varianzas total del conjunto de datos de estas variables.

Este primer factor está formado por un grupo de variables cuya agrupación no se le dio mucha importancia en el análisis cluster. Este primer factor está formado por el carbono inorgánico y orgánico y la temperatura. Al igual que ocurre con la Ría de Huelva, para la Bahía de Cádiz aparecen relacionados la temperatura (signo positivo) y el carbono orgánico (signo negativo). La presencia de la temperatura en este factor, indica una variación estacional en estos parámetros. Al aumentar la temperatura se acelera la actividad biológica por tanto, es posible asociar la disminución de la materia orgánica en forma de carbono y el aumento del contenido de carbono disuelto en las aguas. Este primer factor por tanto, estaría relacionado con **procesos degradativos naturales en las aguas**.

El segundo factor está formado por los parámetros nitratos, amonio y nitrógeno disuelto, es decir, en este segundo factor se aglutina el contenido de nitrógeno disuelto de la Bahía de Cádiz. Ya vimos en apartados anteriores que en esta área ambiental no presenta mucha relevancia los nitritos por tanto no está incluido en este grupo de "nitrógenos". Relacionando estos parámetros con las posibles fuentes (vertidos urbanos y escorrentías agrícolas principalmente), el **segundo factor identifica la entrada de compuestos de nitrógeno asociados con contaminación urbana o agrícola** (Río Guadalete).

El tercer factor está formado exclusivamente por dos parámetros: carbono total y el sílice los cuales pueden estar relacionados con el transporte de sedimentos en la bahía.

El cuarto factor esta formado por los parámetros nitritos, fosfatos y fósforo. Este factor representa la entrada de compuestos fosforados en la bahía. Esta entrada puede deberse a vertidos de aguas residuales puesto que se incluyen los valores de nitritos. Este **cuarto factor** representaría la

contaminación por vertidos de aguas residuales **no reciente** o en **aguas abiertas** frente al **segundo factor** que representaría la **contaminación reciente** o en **aguas limitadas o interiores**.

El quinto factor aparece como el factor que representa la **contaminación por metales** en la Bahía de Cádiz. Los metales de mayor importancia en la Bahía son el plomo y el zinc.

Finalmente, el sexto factor incluye a los parámetros pH y cadmio.

Una vez visto los factores (número e importancia de cada uno) y los parámetros que forman los mismos se puede concluir que **en la Bahía de Cádiz no existen grandes fenómenos de contaminación identificados. Si bien se ha identificado procesos de contaminación por metales, éstos son menos importantes que los aportes de nutrientes que se realizan a la bahía.**

ANÁLISIS FACTORIAL DE 10 VARIABLES

Con objeto de identificar mejor los fenómenos con nutrientes, se ha realizado el PCA/FA de los parámetros relativos a nutrientes. Las siguientes tablas muestran los resultados.

Tabla C II.49. Análisis factorial para 10 variables

| | <i>Autovalores</i> | <i>% Varianza total</i> | <i>Autovalores acumulados</i> | <i>% Varianza acumulado</i> |
|---|--------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 3,625 | 36,251 | 3,625 | 36,251 |
| 2 | 2,061 | 20,606 | 5,686 | 56,858 |
| 3 | 1,556 | 15,557 | 7,242 | 72,415 |
| 4 | 1,370 | 13,702 | 8,612 | 86,117 |

Tabla C II.50. Factores obtenidos para 10 variables

| | <i>Factor 1</i> | <i>Factor 2</i> | <i>Factor 3</i> | <i>Factor 4</i> |
|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| <i>Carbono total</i> | 0,019 | 0,943 | -0,003 | -0,029 |
| <i>Carbono inorgánico</i> | 0,085 | 0,675 | 0,022 | 0,716 |
| <i>Carbono orgánico</i> | -0,091 | 0,062 | -0,031 | -0,960 |
| <i>Nitritos</i> | -0,048 | -0,021 | 0,670 | 0,339 |
| <i>Nitratos</i> | 0,973 | -0,096 | -0,048 | -0,001 |
| <i>Amonio</i> | 0,775 | 0,335 | 0,413 | 0,149 |
| <i>Nitrógeno disuelto</i> | 0,978 | 0,042 | 0,158 | 0,076 |
| <i>Fosfatos</i> | 0,190 | 0,058 | 0,875 | 0,115 |
| <i>Fósforo</i> | 0,178 | 0,177 | 0,838 | -0,197 |
| <i>Silicatos</i> | 0,040 | 0,837 | 0,258 | 0,029 |
| Expl.Var | 2,592 | 2,207 | 2,183 | 1,630 |
| Prp.Totl | 0,259 | 0,221 | 0,218 | 0,163 |

De los cuatro autovalores/autovectores identificados, son especialmente importante los tres primeros puesto que explican el 72,4% de la varianza de la muestra.

El primer factor identifica la especiación de nitrógeno disuelto que ocurre en la Bahía de Cádiz. El segundo factor incluye al grupo formado por carbono total e inorgánico y los silicatos. El tercer factor incluye los compuestos de fósforo, y por último, el cuarto factor incluye las relaciones existentes entre el carbono orgánico e inorgánico.

Como se puede apreciar, se obtienen los mismos factores con las mismas variables que en el análisis de 20 variables, y se confirman las relaciones entre diferentes variables.

Significar de nuevo las relaciones entre el contenido de carbono orgánico e inorgánico las cuales se explicaron en función de la temperatura en el análisis de 20 variables. Significar también que en el análisis de 10 variables, el segundo factor excluye al parámetro nitritos el cual se consideró en asociación con las especies de fósforo en el análisis de 20 variables. Por tanto, este es un parámetro no demasiado trascendental en el análisis factorial.

4.3. RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUARIO DEL RÍO IRO

4.3.1. RESULTADOS PROMEDIO OBTENIDOS EN LAS ESTACIONES DE MUESTREO.

Las siguientes tablas muestran los resultados promedios de dos muestreos realizados en el Río Iro en dos estaciones climatológicas extremas (invierno y verano) en el año 2001.

Las tablas de resultados promedios obtenidos en el Río Iro se han dispuesto según el único transecto longitudinal seleccionado para el seguimiento de esta zona y se incluye la estación control situada próxima a la isla de Sancti Petri. La última columna de la tabla muestra los resultados promedios del transecto excluyendo la estación SP -Sancti Petri, estación exterior al sistema-, con objeto de no distorsionar el resultado promedio del estuario.

Tabla C II.51. Promedio de las variables físico-químicas. RÍO IRO

| Parámetros \ Estaciones | I1 | I2 | I3 | I4 | I5 | I6 | I7 | I8 | SP | RÍO IRO(*) |
|--|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS | | | | | | | | | | |
| C. fecales (UFC/100 mL) | 1,18E+03 | 7,02E+03 | 5,42E+04 | 8,42E+02 | 2,75E+02 | 3,03E+02 | 1,83E+02 | 1,48E+02 | 0,00E+00 | 8,99E+03 |
| Desv. Est. | --- | 6,20E+03 | 7,23E+04 | 8,60E+02 | 9,66E+01 | 7,90E+01 | 7,07E+01 | 8,60E+01 | 0,00E+00 | 2,79E+04 |
| E. fecales (UFC/100 mL) | 1,73E+03 | 1,95E+03 | 2,52E+03 | 4,00E+02 | 7,87E+02 | 3,83E+02 | 1,76E+02 | 1,04E+02 | 1,08E+01 | 9,02E+02 |
| Desv. Est. | --- | 2,29E+03 | 2,38E+03 | 2,83E+02 | 9,52E+02 | 4,18E+02 | 1,54E+02 | 1,00E+02 | 1,53E+01 | 1,33E+03 |
| PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS | | | | | | | | | | |
| pH | 8,04 | 8,00 | 7,88 | 8,02 | 8,02 | 8,03 | 8,05 | 8,06 | 8,20 | 8,01 |
| Desv. Est. | 0,00 | 0,04 | 0,05 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,06 |
| Temperatura (°C) | 24,7 | 23,2 | 23,8 | 23,2 | 22,4 | 22,2 | 22,0 | 21,7 | 20,3 | 22,7 |
| Desv. Est. | --- | 2,2 | 1,9 | 1,8 | 2,7 | 3,0 | 2,8 | 3,0 | 1,8 | 2,0 |
| Salinidad | 35,9 | 36,3 | 31,2 | 35,7 | 36,0 | 35,6 | 35,7 | 36,0 | 33,3 | 35,2 |
| Desv. Est. | --- | 0,1 | 4,1 | 0,6 | 0,8 | 0,0 | 0,6 | 1,2 | 1,7 | 2,0 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 5,805 | 2,759 | 2,541 | 2,810 | 2,592 | 2,012 | 1,003 | 0,559 | 0,071 | 2,290 |
| Desv. Est. | --- | 2,886 | 1,867 | 2,875 | 3,122 | 2,366 | 1,072 | 0,635 | 0,059 | 2,072 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,080 | 0,068 | 0,058 | 0,064 | 0,061 | 0,066 | 0,072 | 0,075 | 0,011 | 0,067 |
| Desv. Est. | --- | 0,008 | 0,008 | 0,022 | 0,026 | 0,035 | 0,053 | 0,060 | 0,008 | 0,026 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,176 | 0,291 | 0,390 | 0,356 | 0,361 | 0,463 | 0,414 | 0,384 | 0,086 | 0,366 |
| Desv. Est. | --- | 0,225 | 0,039 | 0,023 | 0,066 | 0,181 | 0,167 | 0,206 | 0,116 | 0,129 |
| Nitrógeno (mg/L N) | 6,061 | 3,118 | 2,989 | 3,229 | 3,014 | 2,542 | 1,489 | 1,018 | 0,168 | 2,724 |
| Desv. Est. | --- | 2,669 | 1,837 | 2,875 | 3,214 | 2,581 | 1,292 | 0,901 | 0,183 | 2,060 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | 1,207 | 0,655 | 1,312 | 0,612 | 0,598 | 0,486 | 0,267 | 0,161 | 0,085 | 0,626 |
| Desv. Est. | --- | 0,700 | 1,301 | 0,691 | 0,696 | 0,543 | 0,251 | 0,117 | 0,080 | 0,628 |
| Fósforo total (mg/L P) | 1,679 | 0,988 | 1,579 | 0,734 | 0,841 | 0,424 | 0,391 | 0,211 | 0,038 | 0,801 |
| Desv. Est. | --- | 0,919 | 1,403 | 0,621 | 0,843 | 0,275 | 0,254 | 0,156 | 0,041 | 0,730 |
| Silicatos (mg/L Si-SiO₄) | 1,044 | 0,513 | 1,932 | 0,430 | 0,275 | 0,447 | 0,276 | 0,290 | 0,074 | 0,625 |
| Desv. Est. | --- | 0,418 | 2,027 | 0,311 | 0,096 | 0,381 | 0,157 | 0,196 | 0,056 | 0,805 |
| Clorofila a (mg/m³) | 44,022 | 33,534 | 26,042 | 24,637 | 19,122 | 19,934 | 18,935 | 16,911 | 5,466 | 24,150 |
| Desv. Est. | --- | 16,116 | 14,083 | 10,421 | 4,399 | 6,693 | 6,390 | 6,136 | 6,255 | 10,465 |
| Clorofila b (mg/m³) | 14,720 | 8,066 | 3,318 | 5,015 | 6,167 | 4,527 | 5,451 | 2,145 | 0,145 | 5,606 |
| Desv. Est. | --- | 6,454 | 0,225 | 3,393 | 4,623 | 3,122 | 0,326 | 0,400 | 0,007 | 3,945 |
| Clorofila c (mg/m³) | 3,090 | 2,848 | 3,420 | 1,643 | 2,326 | 1,811 | 1,440 | 0,559 | 0,009 | 2,079 |
| Desv. Est. | --- | 0,372 | 1,598 | 0,679 | 0,430 | 0,147 | 0,555 | 1,545 | 0,247 | 1,132 |
| Carbono total (mg/L C) | 56,70 | 47,65 | 48,46 | 45,88 | 46,21 | 45,24 | 39,25 | 39,94 | 29,25 | 45,46 |
| Desv. Est. | --- | 6,99 | 3,06 | 7,95 | 7,15 | 3,91 | 5,16 | 0,12 | 0,60 | 6,02 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 49,31 | 42,63 | 24,47 | 24,02 | 23,92 | 23,25 | 20,31 | 20,39 | 14,98 | 27,15 |
| Desv. Est. | --- | 4,66 | 28,59 | 30,24 | 29,92 | 27,34 | 26,45 | 23,61 | 19,56 | 20,52 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 7,27 | 5,53 | 5,10 | 3,71 | 3,17 | 4,01 | 2,38 | 3,42 | 1,01 | 4,12 |
| Desv. Est. | --- | 3,05 | 1,20 | 1,51 | 0,58 | 0,12 | 1,08 | 0,38 | 0,21 | 1,68 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 17,0 | 59,3 | 96,0 | 94,8 | 92,3 | 82,3 | 84,0 | 80,8 | 40,0 | 79,7 |
| Desv. Est. | --- | 58,3 | 78,5 | 95,8 | 68,2 | 74,6 | 80,6 | 77,4 | 38,2 | 58,3 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 9,0 | 11,5 | 25,0 | 14,8 | 19,3 | 15,0 | 14,3 | 12,8 | 8,5 | 15,6 |
| Desv. Est. | --- | 3,5 | 4,2 | 7,4 | 1,1 | 7,1 | 6,0 | 7,4 | 7,8 | 6,2 |

(*) No se incluye en el promedio del transecto, los valores obtenidos en la estación SP

4.3.2. ESTUDIO ESTADÍSTICO DEL ESTUARIO DEL RÍO IRO.

La estadística descriptiva de los transectos de la Bahía de Cádiz se ha realizado mediante el paquete estadístico Statistica 6,0 (StatSoft, 1997).

Con objeto de obtener resultados representativos, los parámetros seleccionados para este análisis estadístico son aquellos que se han determinado con más frecuencia y en todas las estaciones de muestreo. Estos son:

- Coliformes fecales
- Estreptococos fecales
- pH
- Temperatura
- Salinidad
- Amonio
- Nitritos
- Nitratos
- Fosfatos
- Fósforo total
- Silicatos
- Clorofila *a*
- Clorofila *b*
- Clorofila *c*
- Carbono disuelto
- Carbono inorgánico disuelto
- Carbono orgánico disuelto
- Sólidos en suspensión
- Sólidos volátiles

Tabla C II.52. Estudio estadístico del Río Iro

| Río Iro | N Válidos | IntConf. -95% | Media | IntConf. +95% | Desv. Est. | Mediana | Mínimo | Máximo | Cuartil Inferior | Cuartil Superior | Varianza |
|---------------------------------------|-----------|---------------|---------|---------------|------------|---------|---------|---------|------------------|------------------|----------|
| C. fecales(UFC/100 mL) | 15 | 2,5E+04 | 9,0E+03 | -7,1E+03 | 2,8E+04 | 3,0E+02 | 8,7E+01 | 1,1E+05 | 2,1E+02 | 2,6E+03 | |
| E. fecales (UFC/100 mL) | 15 | 1,7E+03 | 9,0E+02 | 1,4E+02 | 1,3E+03 | 3,1E+02 | 3,3E+01 | 4,2E+03 | 1,1E+02 | 8,3E+02 | |
| pH | 15 | 7,97 | 8,01 | 8,04 | 0,06 | 8,03 | 7,83 | 8,08 | 7,99 | 8,04 | 4,00E-03 |
| T (°C) | 15 | 21,6 | 22,7 | 23,9 | 2,0 | 23,8 | 19,5 | 25,1 | 20,5 | 24,4 | 4,02E+00 |
| S | 15 | 34,1 | 35,2 | 36,4 | 2,0 | 35,6 | 28,3 | 36,8 | 35,2 | 36,2 | 4,14E+00 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 15 | 1,143 | 2,290 | 3,438 | 2,072 | 1,221 | 0,110 | 5,805 | 0,385 | 4,800 | 4,29E+00 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 15 | 0,053 | 0,067 | 0,082 | 0,026 | 0,063 | 0,033 | 0,118 | 0,043 | 0,080 | 1,00E-03 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 15 | 0,295 | 0,366 | 0,438 | 0,129 | 0,363 | 0,132 | 0,591 | 0,296 | 0,451 | 1,70E-02 |
| ΣN (mg/L N) | 15 | 1,583 | 2,724 | 3,865 | 2,060 | 1,690 | 0,381 | 6,061 | 0,741 | 5,005 | 3,95E-01 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 15 | 0,278 | 0,626 | 0,974 | 0,628 | 0,391 | 0,079 | 2,232 | 0,106 | 1,101 | 3,95E-01 |
| P total (mg/L P) | 15 | 0,397 | 0,801 | 1,205 | 0,730 | 0,571 | 0,101 | 2,570 | 0,244 | 1,437 | 5,32E-01 |
| Silicatos (mg/L Si-SiO ₄) | 15 | 0,179 | 0,625 | 1,070 | 0,805 | 0,386 | 0,152 | 3,365 | 0,208 | 0,716 | 6,48E-01 |
| Clorofila a (mg/m ³) | 15 | 15,490 | 12,750 | 10,010 | 6,020 | 12,572 | 2,697 | 22,100 | 10,061 | 16,083 | 1,09E+02 |
| Clorofila b (mg/m ³) | 15 | 3,230 | 2,351 | 1,470 | 1,940 | 2,616 | 0,000 | 6,400 | 0,221 | 3,159 | 1,55E+01 |
| Clorofila c (mg/m ³) | 15 | 1,340 | 0,911 | 0,490 | 0,930 | 0,708 | 0,000 | 2,600 | 0,000 | 1,795 | 1,28E+00 |
| CT (mg/L C) | 15 | 42,11 | 40,36 | 38,61 | 3,85 | 39,85 | 32,16 | 47,70 | 38,51 | 42,83 | 3,63E+01 |
| Cl (mg/L C) | 15 | 32,55 | 25,74 | 18,93 | 14,96 | 33,64 | 1,61 | 40,10 | 3,92 | 35,21 | 4,20E+02 |
| COT (mg/L C) | 15 | 3,31 | 4,53 | 5,75 | 2,21 | 3,92 | 1,61 | 9,71 | 3,14 | 5,94 | 4,86E+00 |
| SS (mg/L) | 15 | 47,4 | 79,7 | 112,0 | 58,3 | 44,0 | 17,0 | 162,5 | 27,0 | 140,5 | 3,40E+03 |
| SV (mg/L) | 15 | 12,2 | 15,6 | 19,0 | 6,2 | 18,0 | 7,5 | 28,0 | 9,5 | 20,0 | 3,79E+01 |

Tabla C II.53. Estudio estadístico de Sancti Petri

| Sancti Petri | N Válidos | IntConf. -95% | Media | IntConf. +95% | Desv. Est. | Mediana | Mínimo | Máximo | Varianza |
|---------------------------------------|-----------|---------------|---------|---------------|------------|---------|---------|---------|----------|
| C. fecales(UFC/100 mL) | 2 | --- | 0,0E+00 | --- | 0,0E+00 | 0,0E+00 | 0,0E+00 | 0,0E+00 | |
| E. fecales (UFC/100 mL) | 2 | -1,3E+02 | 1,1E+01 | 1,5E+02 | 1,5E+01 | 1,1E+01 | 0,0E+00 | 2,2E+01 | |
| pH | 2 | 7,82 | 8,20 | 8,58 | 0,04 | 8,20 | 8,17 | 8,23 | 2,00E-03 |
| T (°C) | 2 | 4,4 | 20,3 | 36,1 | 1,8 | 20,3 | 19,0 | 21,5 | 3,13E+00 |
| S | 2 | 18,1 | 33,3 | 48,5 | 1,7 | 33,3 | 32,1 | 34,5 | 2,88E+00 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 2 | -0,458 | 0,071 | 0,600 | 0,059 | 0,071 | 0,029 | 0,113 | 3,00E-03 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 2 | -0,062 | 0,011 | 0,083 | 0,008 | 0,011 | 0,005 | 0,016 | 0,00E+00 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 2 | -0,957 | 0,086 | 1,130 | 0,116 | 0,086 | 0,004 | 0,168 | 1,30E-02 |
| ΣN (mg/L N) | 2 | -1,476 | 0,168 | 1,812 | 0,183 | 0,168 | 0,039 | 0,297 | 6,00E-03 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 2 | -0,636 | 0,085 | 0,805 | 0,080 | 0,085 | 0,028 | 0,142 | 6,00E-03 |
| P total (mg/L P) | 2 | -0,327 | 0,038 | 0,403 | 0,041 | 0,038 | 0,009 | 0,067 | 2,00E-03 |
| Silicatos (mg/L Si-SiO ₄) | 2 | -0,430 | 0,074 | 0,579 | 0,056 | 0,074 | 0,034 | 0,114 | 3,00E-03 |
| Clorofila a (mg/m ³) | 2 | -1,692 | 1,545 | 4,782 | 1,303 | 1,044 | 0,567 | 3,025 | 3,91E+01 |
| Clorofila b (mg/m ³) | 2 | -0,918 | 0,406 | 1,730 | 0,533 | 0,150 | 0,049 | 1,018 | 0,000 |
| Clorofila c (mg/m ³) | 2 | -1,263 | 0,498 | 2,258 | 0,709 | 0,184 | 0,000 | 1,309 | 6,1E-02 |
| CT (mg/L C) | 2 | -12,904 | 3,950 | 20,805 | 6,785 | 0,034 | 0,032 | 11,785 | 3,61E-01 |
| Cl (mg/L C) | 2 | -1,692 | 1,545 | 4,782 | 1,303 | 1,044 | 0,567 | 3,025 | 3,83E+02 |
| COT (mg/L C) | 2 | -0,84 | 1,01 | 2,85 | 0,21 | 1,01 | 0,86 | 1,15 | 4,20E-02 |
| SS (mg/L) | 2 | -303,1 | 40,0 | 383,1 | 38,2 | 40,0 | 13,0 | 67,0 | 1,46E+03 |
| SV (mg/L) | 2 | -61,4 | 8,5 | 78,4 | 7,8 | 8,5 | 3,0 | 14,0 | 6,05E+01 |

4.3.3. HISTOGRAMAS DE FRECUENCIAS. DIAGRAMAS DE DATOS ORDENADOS. DIAGRAMAS DE BOX-WHISKERS.

Se han representado los histogramas de frecuencia, diagramas de datos ordenados y diagramas de box-whiskers de las variables más importantes medidas en el Río Iro. Para la elaboración de los histogramas se han seguido las directrices marcadas por la *Guía para la evaluación de la calidad de los datos* publicada por la Oficina de Investigación y Desarrollo de la USEPA (USEPA, 1998).

La primera clase (Clase 0) de cada parámetro está formada por aquellas observaciones cuyos resultados han resultado inferiores a los límites de detección de los métodos analíticos.

Los histogramas de frecuencia se han dividido en 10 clases principales de intervalos regulares de concentración seleccionados en función del rango de concentraciones de cada parámetro. Aquellas variables cuyos rangos de concentraciones se encuentran en el rango calculado en la Ría de Huelva y Bahía de Cádiz, se han mantenido los mismos intervalos de clases. Para aquellas variables cuyo rango de concentraciones es muy distinto, se han seleccionado nuevos intervalos de clase acordes con las concentraciones.

Debido a los altos niveles medidos en esta área ambiental, los intervalos de clase de todos los parámetros del Río Iro incluidos en este apartado, son diferentes de los seleccionados en Huelva y Cádiz.

Las consideraciones que se han realizado para la elaboración de estos diagramas en relación con los criterios de selección de clases, expresión de las variables, diseño de los diagramas de cajas y bigotes, y la expresión que definen los valores extremos y los valores anómalos son los mismos que los comentados para las anteriores áreas ambientales.

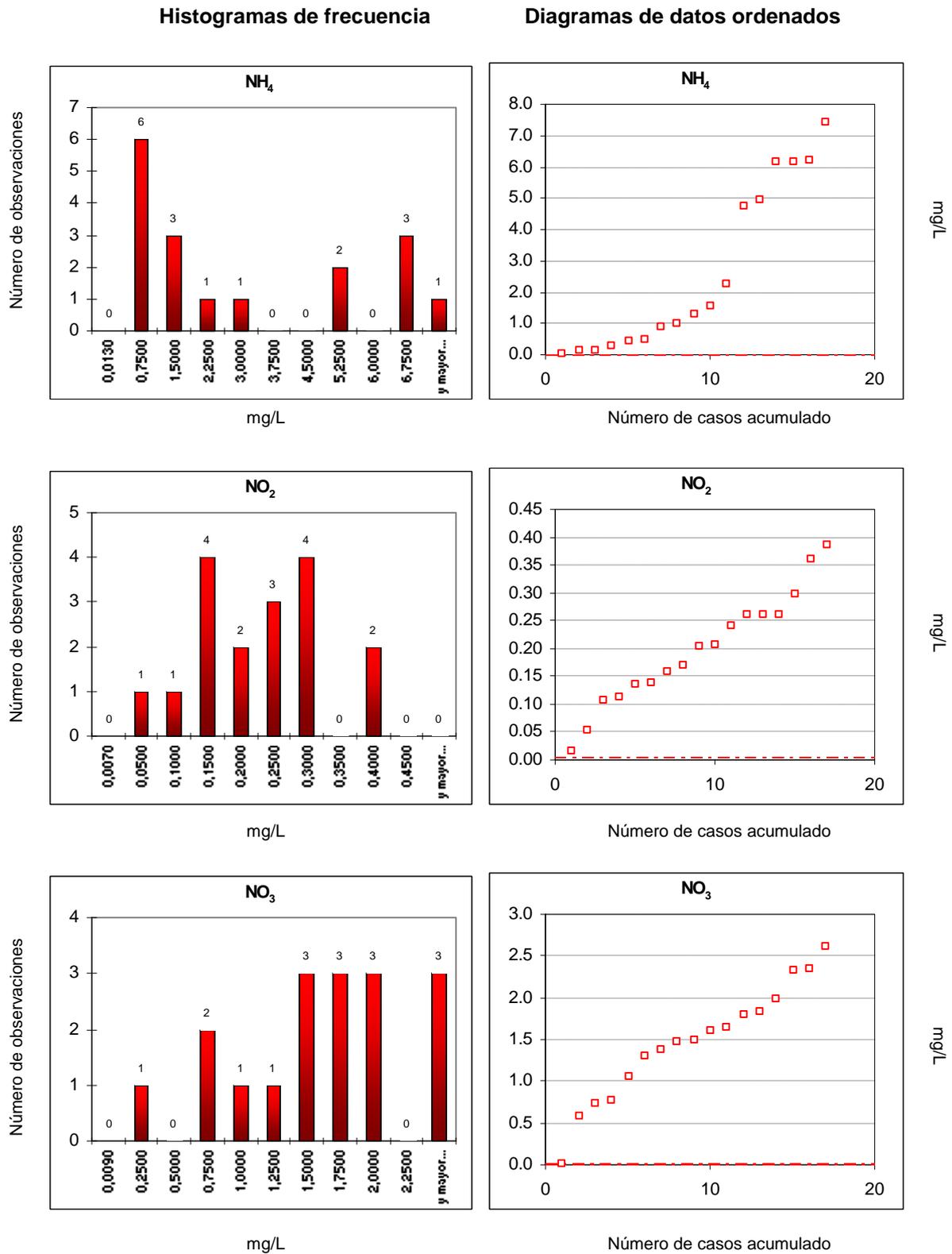


Figura C II.9.
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍO IRO

Diagrama de box-whisker

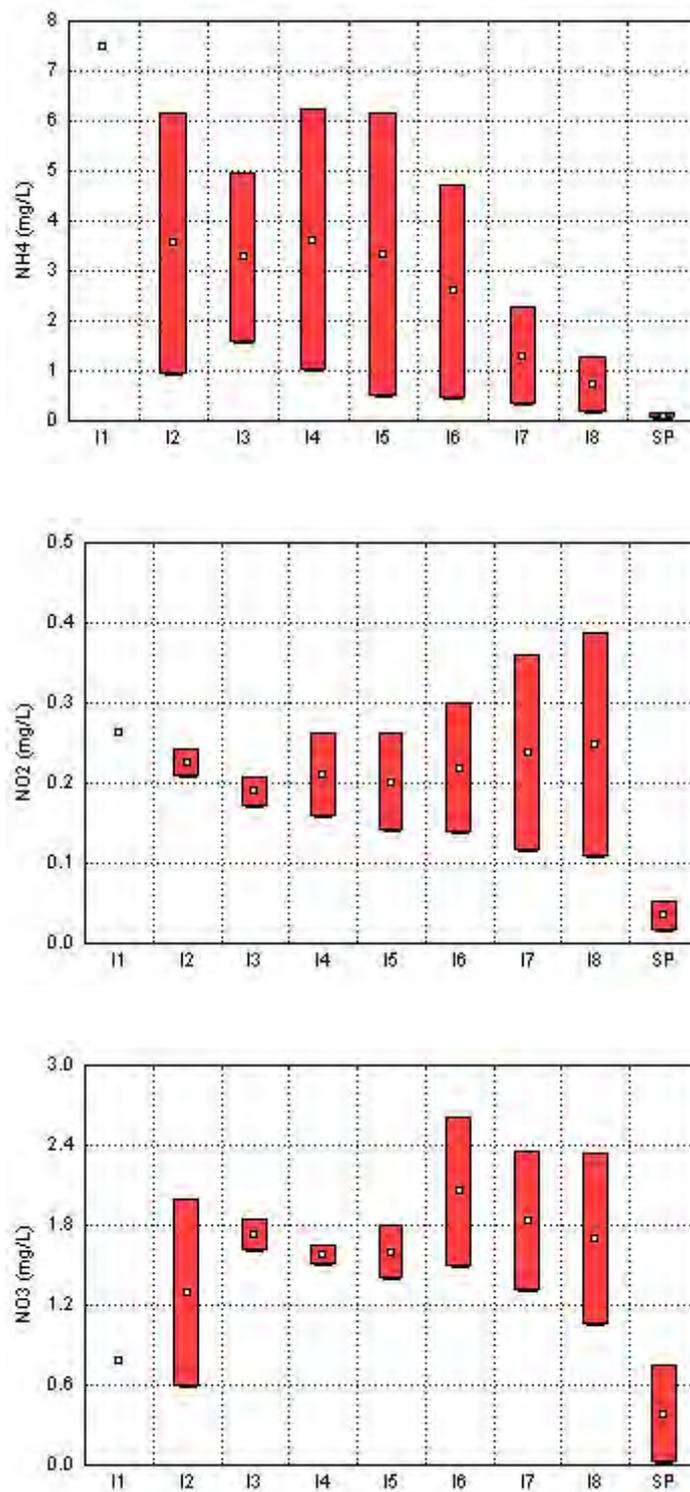


Figura C II.9.
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍO IRO

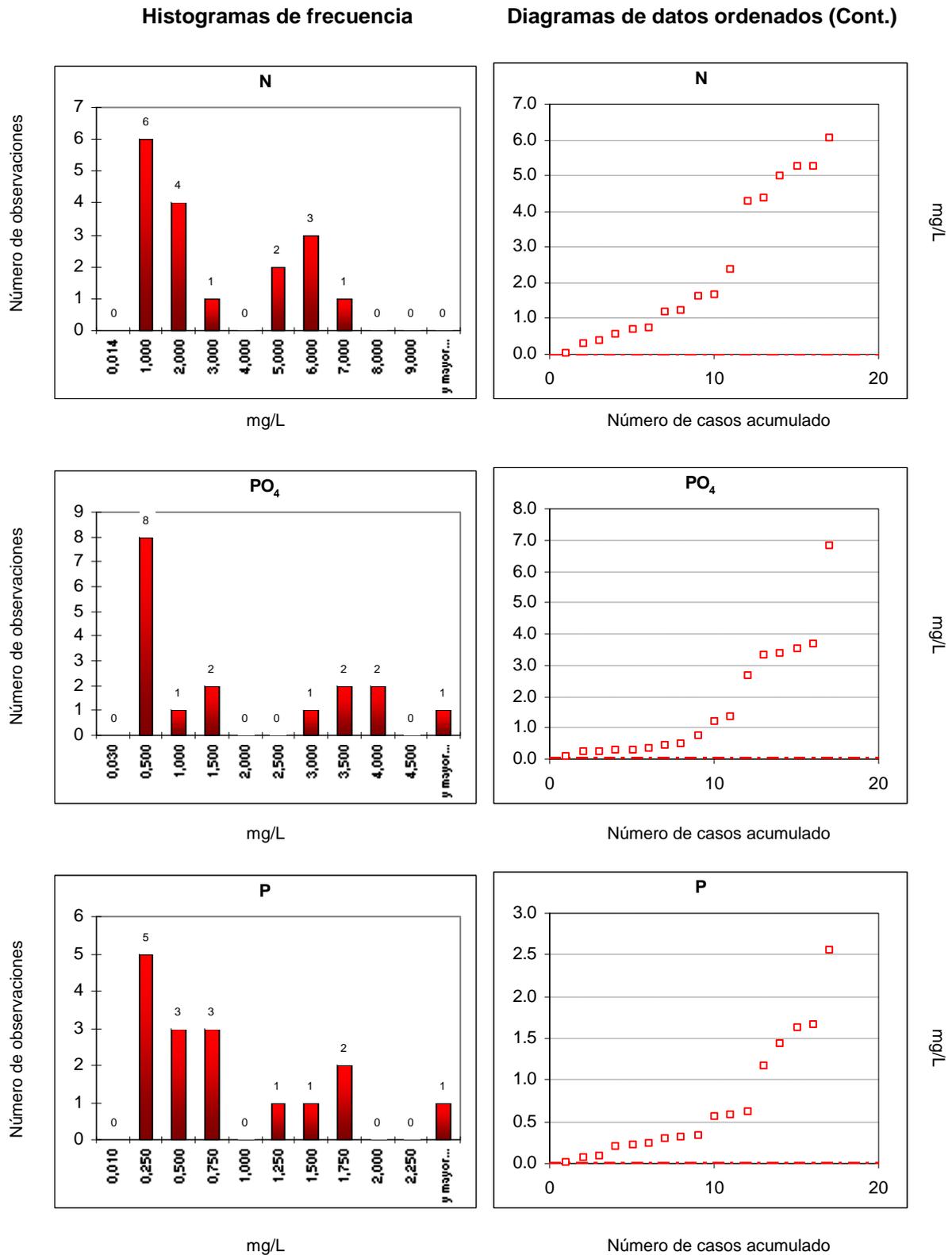


Figura C II.9. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍO IRO

Diagrama de box-whisker (Cont.)

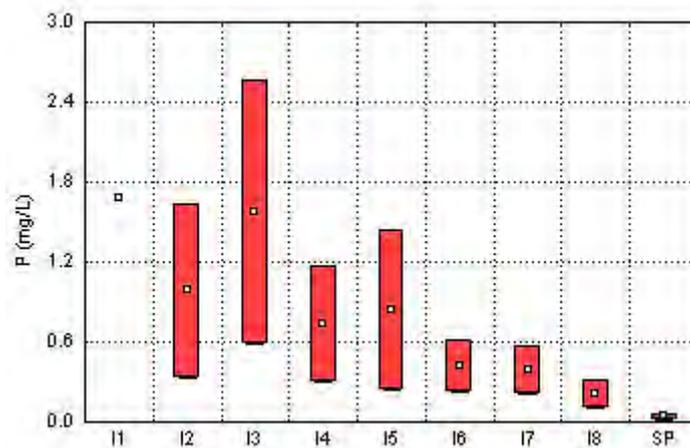
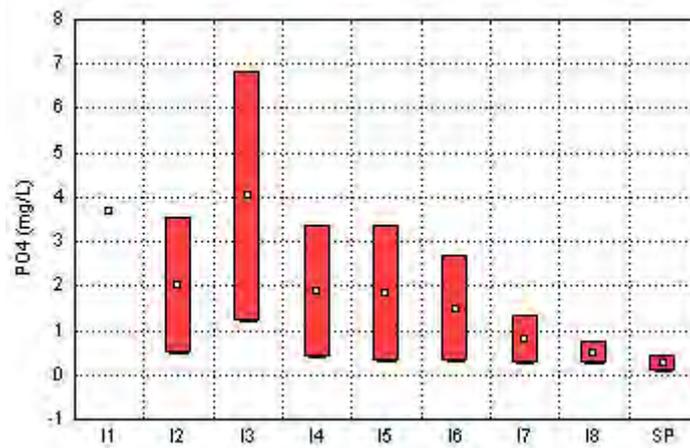
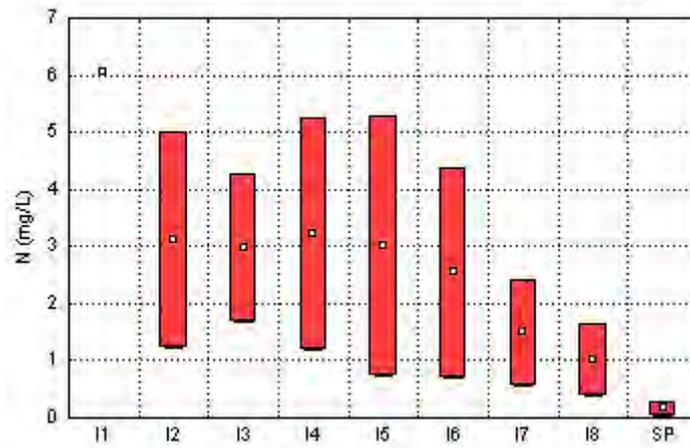


Figura C II.9. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍO IRO

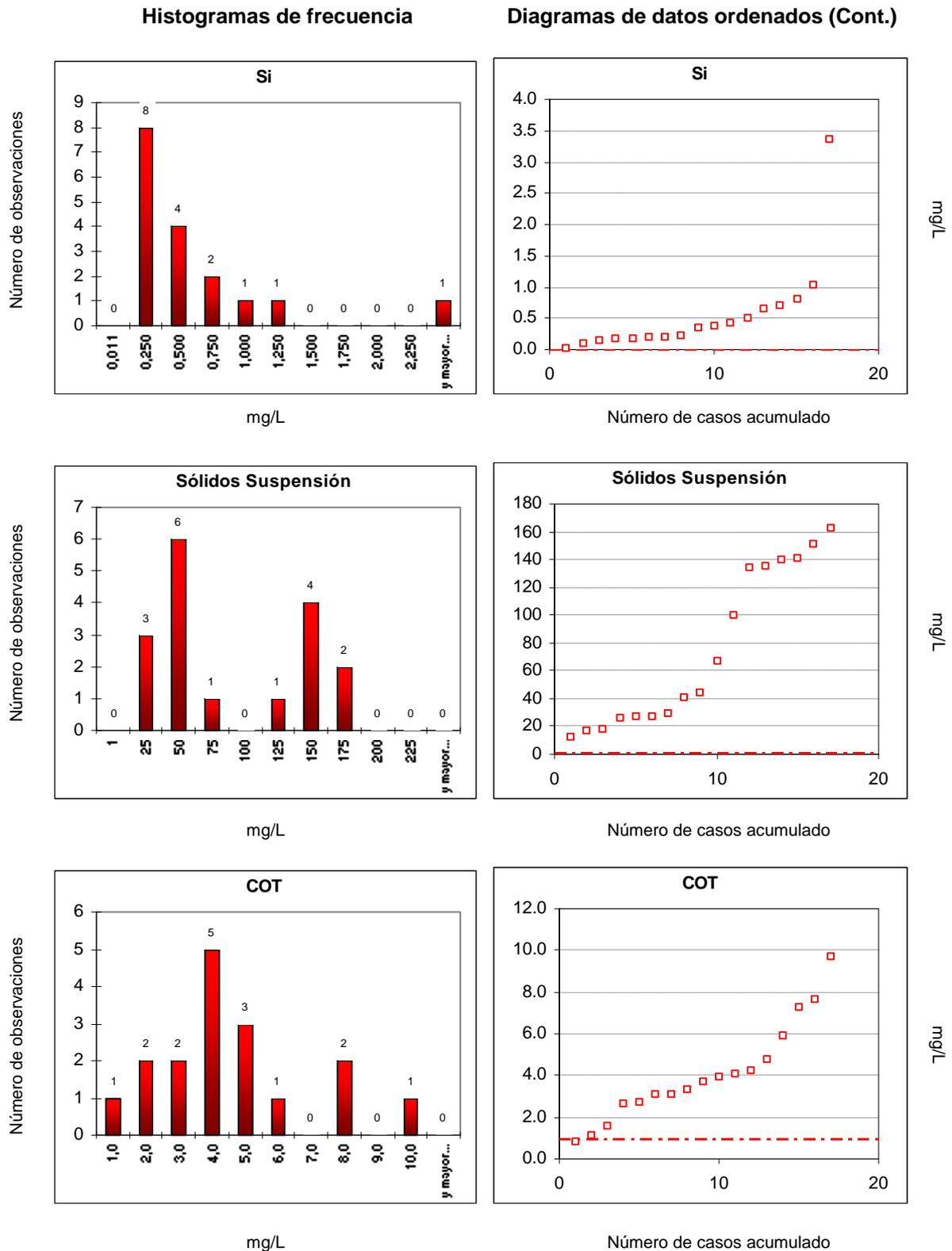


Figura C II.9. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍO IRO

Diagrama de box-whisker (Cont.)

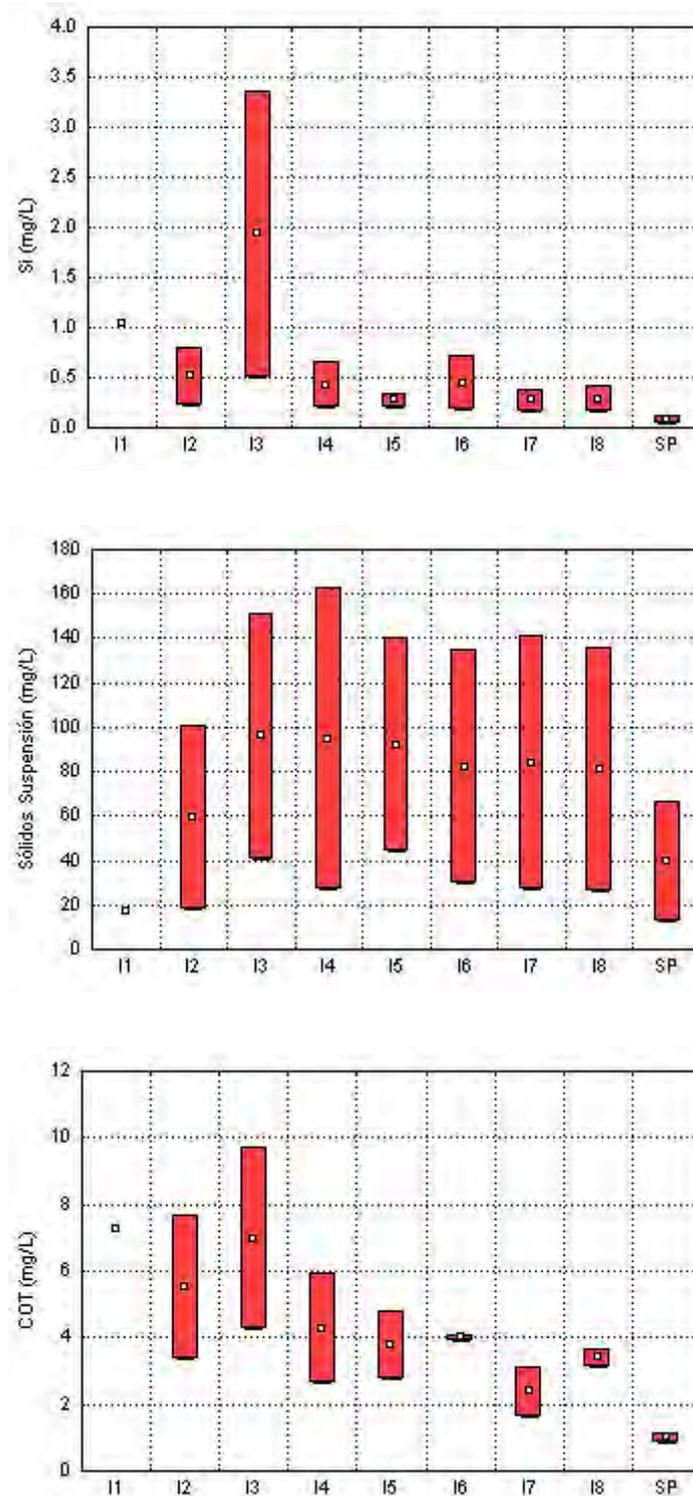


Figura C II.9. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
RÍO IRO

AMONIO

El histograma de frecuencia del parámetro *amonio* se ha construido a partir de un total de 17 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 750 $\mu\text{g/L NH}_4^+$. La clase-0 incluye a todas las observaciones inferiores a 13 $\mu\text{g/L}$. La clase-10 incluye todas aquellas observaciones superiores a 6750 $\mu\text{g/L}$. En términos de porcentaje todas las observaciones han sido detectadas. La clase-2 de 1500 $\mu\text{g/L}$ incluye el 53% de las observaciones. Por debajo de los 5250 $\mu\text{g/L}$ se resumen el 76% de los casos, y finalmente la clase-9 de 6750 $\mu\text{g/L}$ incluye el 94% de los casos.

El diagrama de datos ordenados muestra una figura sigmoideal en la distribución de los valores diferenciando dos zonas, una zona de "bajas" concentraciones de evolución lineal, y una zona de altas concentraciones correspondientes a los resultados de las estaciones I1 a I6 de uno de los dos muestreos incluidos en este estudio.

En los diagramas de box-whiskers se observan claramente como existe una **variabilidad espacial en la concentración de amonio a lo largo del estuario**. Las altas concentraciones de amonio en las dos estaciones previas al punto de vertido muestran la influencia de la **marea** en estos puntos la cual **conduce la contaminación del río aguas arriba**. Podría pensarse que existen fuentes puntuales y/o difusas aguas arriba que introduce amonio en las aguas. En muestras tomadas aguas arriba donde la salinidad es inferior a 1, las aguas no presentaban amonio en cantidades significativas.

Respecto a la forma de las cajas, al incluir sólo dos mediciones no es posible identificar valores anómalos y extremos. Para este parámetro, se observa una representación de box-whisker formado por una caja de gran amplitud, con whiskers superior mayor que el inferior y con un valor de mediana desplazada hacia la zona inferior de la caja centrándose en 1221 $\mu\text{g/L NH}_4^+$.

NITRITOS

El histograma de frecuencias para la representación de *nitritos* se ha construido a partir de 17 casos clasificados en 10 clases de intervalos de 50 $\mu\text{g/L NO}_2^-$ cada una. La clase-0 no incluye ninguna de las observaciones realizadas. El 47% de los casos se muestran por debajo de 200 $\mu\text{g/L}$, el 88% por debajo de 300 $\mu\text{g/L}$ y finalmente, el 100% de las observaciones se localizan por debajo de los 400 $\mu\text{g/L}$.

En el diagrama de datos ordenados, se observa una evolución lineal de los valores de nitritos en el estuario, las concentraciones menores se localizan en las observaciones realizadas en Sancti Petri y las observaciones más altas en la estación I8.

En el diagrama de Box-whisker se observa nuevamente una **variabilidad espacial** del parámetro a lo largo del estuario. En este caso el sentido de esta variación es contrario al obtenido con amonio, esto es, mientras que el amonio desciende su concentración a medida que las estaciones se localizan en posiciones más exteriores hacia la desembocadura, para el caso de los nitritos, los niveles aumentan. La variabilidad espacial de ambos parámetros es la que cabría esperar puesto que los nitritos aparecen en las aguas por oxidación del amonio, por tanto, es natural que a medida que desciende la concentración de amonio, aumenta la concentración de nitritos.

NITRATOS

El histograma de frecuencias de los *nitratos* está formado por clases de 250 $\mu\text{g/L NO}_3^-$. Para este parámetro no ha habido casos no detectados. El histograma muestra como el 60% de las observaciones presentan concentraciones inferiores a 1750 $\mu\text{g/L}$, el 80% presentan menos de 2000 $\mu\text{g/L}$, y la última clase resume las mediciones más altas con un valor máximo de 2616 $\mu\text{g/L}$ localizado en I6.

Con relación a los diagramas de datos ordenados, los *nitratos* presentan una evolución muy similar a la obtenida para los *nitritos*.

La forma del diagrama de box-whisker para este parámetro es algo más compleja puesto que la concentración de nitratos en las aguas del estuario va a depender a medio-largo plazo de los niveles de amonio aportados por las aguas residuales. Así, en general puede decirse que la **variación espacial** sigue la misma forma que los *nitritos* a lo largo del estuario. Observando comparativamente los niveles de *nitritos* y *nitratos* a lo largo del estuario, se comprueba que los niveles de *nitritos* son muy inferiores debido a que es una especie muy inestable y que rápidamente se oxida a *nitratos*, siendo por ello la concentración de esta última mucho mayor.

NITRÓGENO

Mediante este parámetro se resume el contenido de nitrógeno disuelto en el estuario del Río Iro. Realizando el cálculo de los porcentajes de aportación de cada una de las especies de nitrógeno sobre el contenido total se obtiene los siguiente:

| <i>Datos</i> | <i>Río Iro</i> | <i>Sancti Petri</i> |
|--------------------------------------|----------------|---------------------|
| Promedio de N-NH ₄ (mg/L) | 2.290 | 0.071 |
| Promedio de N-NO ₂ (mg/L) | 0.067 | 0.011 |
| Promedio de N-NO ₃ (mg/L) | 0.366 | 0.086 |
| ΣN (mg/L) | 2.723 | 0.168 |
| % N-NH ₄ | 84.1 | 42.3 |
| % N-NO ₂ | 2.5 | 6.5 |
| % N-NO ₃ | 13.4 | 51.2 |
| % ΣN | 100.0 | 100.0 |

Vemos como claramente la **especie dominante en el río es el amonio** seguido de *nitratos* y *nitritos*. Así pues, se puede decirse que **el río presenta una fuerte contaminación reciente o continua provocada por aguas residuales**. La influencia de todo el sistema de marismas en general se deja notar en la estación de Sancti Petri. Si bien esta estación está situada en aguas relativamente abiertas no podemos considerarla como "estación de referencia" de aguas limpias en todos los casos. Si es cierto que es una estación con un agua de gran calidad, pero en ocasiones se ve influenciada por la corriente de salida del caño Sancti Petri.

El histograma de frecuencias para la representación de *nitrógeno* se ha realizado en intervalos de clase de 1000 µg/L N. La clase-2 de 2000 µg/L resume el 59 % de las observaciones, por debajo de 5000 µg/L se encuentra el 76% de los casos y finalmente por debajo de 6000 µg/L se encuentra el 94% de los niveles de N disuelto.

Con relación a la representación de datos ordenados se diferencian dos zonas, una inferior en la que se concentran los valores de Sancti Petri y de uno de los muestreos, y una zona superior donde se concentran los valores del río en el otro muestreo que se realizó.

Respecto al diagrama de box-whisker, al ser el amonio la especie dominante en el sistema, es lógico que este diagrama muestre la misma variación espacial. Así en términos de **N disuelto en el Río Iro** se observa una **fuerte contaminación en las estaciones interiores (antes y después del vertido) y un descenso progresivo a medida que las estaciones se localizan más aguas abajo**.

FOSFATOS

El histograma de frecuencia del parámetro *fosfatos* se ha construido en intervalos de 500 µg/L PO₄³⁻. Para este parámetro, no ha habido casos no detectados. Porcentualmente tenemos que el 53% de los

casos se localiza por debajo de 1000 $\mu\text{g/L PO}_4^{3-}$, el 82% por debajo de 3500 $\mu\text{g/L}$ y el 94% por debajo de 4000 $\mu\text{g/L}$.

El diagrama de datos ordenados muestra nuevamente dos zonas y una cierta forma sigmoïdal. La localización de las estaciones de cada observación es aproximadamente la misma que la observada en el caso de las especies de nitrógeno. La zona inferior se corresponde con las observaciones realizadas en Sancti Petri, en las estaciones más exteriores de ambos muestreos y en las estaciones de muestreo interiores del muestreo de primavera. La zona de concentraciones altas se corresponde con las estaciones interiores del muestreo realizado en otoño.

Respecto al diagrama de box-whisker se observa claramente un **variabilidad espacial** que comienza en el punto de vertido de aguas residuales en I3 y un descenso progresivo a medida que las estaciones se localizan aguas abajo. Sancti Petri también se ve afectada por la concentración de fosfatos de las marismas de Sancti Petri.

FÓSFORO

El histograma de frecuencia del parámetro *fósforo total* se ha construido en intervalos de 250 $\mu\text{g/L}$. En términos de porcentaje el 50% de las muestras se sitúa por debajo de los 750 $\mu\text{g/L}$, el 75% por debajo de los 1250 $\mu\text{g/L}$ y el 94% por debajo de los 1750 $\mu\text{g/L}$.

El diagrama de datos ordenados muestra la **variabilidad espacial** y la diferenciación en dos zonas descrita en el apartado anterior y el diagrama de box-whisker toma la misma forma y evolución que el parámetro fosfatos.

SILICATOS

El histograma de frecuencia del parámetro *silicatos* se ha construido en intervalos de clase de 250 $\mu\text{g/L Si}$. El 47% de los casos se incluyen en la clase-1 de 250 $\mu\text{g/L}$, el 82% en los primeros 750 $\mu\text{g/L}$ y finalmente el 94% de los casos no superan los 1250 $\mu\text{g/L}$.

La forma del diagrama de datos ordenados y el de box-whisker indican que el vertido se hace notar en el río provocando un gran aumento en la concentración de silicatos (punto superior del diagrama de datos ordenados). Estas altas concentraciones son rápidamente asimiladas por el medio natural desapareciendo de las aguas bien por procesos biológicos o bien por sedimentación. En el estuario, en I6 aumenta ligeramente la concentración. Esta estación se localiza en una zona de confluencia de canales que llevan a diversas salinas y esteros de la zona por lo que puede estar influenciado por éstos. En el resto de parámetros, no se ha detectado esta variación, debido a las altas concentraciones de los parámetros las cuales han podido enmascarar esta influencia.

SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN

Los intervalos de clases de este parámetro han sido de 25 mg/L . En el 53% de los casos se han obtenido valores inferiores a 50 mg/L , el 88% ha presentado valores inferiores a 150 mg/L y por último, el 100% de las muestras no ha superado los 175 mg/L de sólidos en suspensión.

El diagrama de datos ordenados muestra la misma forma observada en los otros parámetros sin embargo la localización de cada punto cambia radicalmente. Mientras que en el resto de parámetros se observan valores muy superiores en el muestreo de otoño, para este parámetro es todo lo contrario, es decir, los mayores valores se han obtenido en el muestreo de primavera. Para las observaciones en Sancti Petri también ocurre esta situación pero considerando que las dos observaciones se mantienen en el grupo inferior de valores.

El diagrama de box-whisker muestra concentraciones muy similares a lo largo del sistema e incluso concentraciones considerables en Sancti-Petri (40 mg/L). Para este parámetro se observan concentraciones inferiores en I1 e I2 (aguas arriba del vertido). Parece ser que si bien la marea ejerce una gran influencia en los parámetros "disueltos" no lo hace tanto con el material en suspensión. En este tramo de estuario casi en el límite de influencia de la marea, ésta no presenta tanta energía y por tanto ejercerá influencia sobre el material disuelto pero no tanta en el material particulado. En I2 y fundamentalmente en I1 la concentración de sólidos en suspensión se debe fundamentalmente a los aportes que puedan venir de la cabecera del río.

COT

Para este parámetro se han establecido clases de 1 mg/L C. La clase-0 incluye un valor no-detectado en Sancti Petri (0,86 mg/L). Si bien la medición individual si detectó este valor, el límite de detección global fijado para las cuatro áreas ambientales de 1 mg/L no lo considera como detectado. El 59% de los casos se encuentra por debajo de los 4 mg/L, el 76% por debajo de los 5 mg/L y finalmente el 94% de las muestras han obtenido valores inferiores a 8 mg/L C.

El diagrama de datos ordenados no muestra tan claramente la diferenciación de dos grupos obtenidas en anteriores parámetros. Los valores inferiores son los correspondientes a Sancti Petri. El tramo superior se corresponde con las estaciones interiores en el muestreo de otoño, y el tramo intermedio de evolución lineal se corresponde con el resto de observaciones.

El diagrama de box-whisker muestra una **variación espacial** de este parámetro, produciéndose un pico de concentración en la estación localizada en el punto de vertido. Al ser contenido de carbono orgánico disuelto, en I1 e I2 se muestran valores muy altos producidos por el efecto de la marea.

4.3.4. MATRIZ DE CORRELACIÓN. ANÁLISIS CLUSTER. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.

Mediante el paquete informático Statistica 6.0 (StatSoft Inc. 1997) se ha computado la matriz de correlación de las variables estudiadas en el estuario del Río Iro además de un análisis cluster y el análisis de componentes principales y análisis factorial de las variables.

Además, se ha realizado el cluster de las estaciones de muestreo con objeto de clasificar las estaciones de muestreo en función de la calidad de las aguas.

4.3.4.1. MATRIZ DE CORRELACIÓN

Se ha realizado la *matriz de correlación* de Pearson de las variables físico-químicas más estudiadas en el estuario del Río Iro. Para esta área ambiental el número de casos computados ha sido N=17. Para este número de casos, se han marcado mediante estilo subrayado y negrita, las correlaciones significativas ($p < 0,05$).

Tabla C II.54. Matriz de correlaciones de las variables en el Río Iro

| | pH | T | S | NH ₄ | NO ₂ | NO ₃ | SN | PO ₄ | P | Si | Cl a | Cl b | Cl c | CT | Cl | COT | SS | SV | |
|-----------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|-------------|--------------|-------------|-------------|-------------|--------------|-------|-------------|------|--|
| pH | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| T | -0.29 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S | 0.25 | -0.19 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NH ₄ | -0.24 | <u>0.85</u> | 0.01 | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| NO ₂ | -0.24 | <u>0.80</u> | 0.17 | <u>0.56</u> | 1.00 | | | | | | | | | | | | | | |
| NO ₃ | -0.41 | 0.39 | 0.06 | 0.05 | <u>0.70</u> | 1.00 | | | | | | | | | | | | | |
| SN | -0.27 | <u>0.88</u> | 0.02 | <u>1.00</u> | <u>0.62</u> | 0.14 | 1.00 | | | | | | | | | | | | |
| PO ₄ | -0.48 | <u>0.81</u> | -0.46 | <u>0.85</u> | 0.42 | 0.07 | <u>0.85</u> | 1.00 | | | | | | | | | | | |
| P | <u>-0.52</u> | <u>0.78</u> | -0.39 | <u>0.85</u> | 0.41 | -0.01 | <u>0.85</u> | <u>0.97</u> | 1.00 | | | | | | | | | | |
| Si | <u>-0.62</u> | <u>0.59</u> | <u>-0.74</u> | <u>0.52</u> | 0.25 | 0.09 | <u>0.52</u> | <u>0.88</u> | <u>0.84</u> | 1.00 | | | | | | | | | |
| Cl a | -0.40 | <u>0.83</u> | -0.04 | <u>0.86</u> | <u>0.62</u> | 0.09 | <u>0.86</u> | <u>0.79</u> | <u>0.83</u> | <u>0.60</u> | 1.00 | | | | | | | | |
| Cl b | -0.14 | <u>0.65</u> | 0.35 | <u>0.87</u> | <u>0.49</u> | -0.05 | <u>0.85</u> | <u>0.57</u> | <u>0.65</u> | <u>0.22</u> | <u>0.83</u> | 1.00 | | | | | | | |
| Cl c | <u>-0.79</u> | 0.43 | -0.22 | <u>0.54</u> | 0.17 | 0.08 | <u>0.54</u> | <u>0.68</u> | <u>0.75</u> | <u>0.66</u> | <u>0.64</u> | <u>0.50</u> | 1.00 | | | | | | |
| CT | <u>-0.56</u> | <u>0.78</u> | 0.09 | <u>0.88</u> | <u>0.63</u> | 0.26 | <u>0.90</u> | <u>0.77</u> | <u>0.80</u> | <u>0.52</u> | <u>0.88</u> | <u>0.81</u> | <u>0.72</u> | 1.00 | | | | | |
| Cl | -0.06 | <u>0.88</u> | -0.10 | <u>0.79</u> | <u>0.71</u> | 0.27 | <u>0.81</u> | <u>0.72</u> | <u>0.68</u> | 0.47 | <u>0.77</u> | <u>0.62</u> | 0.31 | <u>0.65</u> | 1.00 | | | | |
| COT | <u>-0.49</u> | <u>0.67</u> | 0.00 | <u>0.79</u> | 0.47 | -0.01 | <u>0.78</u> | <u>0.74</u> | <u>0.80</u> | <u>0.58</u> | <u>0.91</u> | <u>0.77</u> | <u>0.71</u> | <u>0.90</u> | <u>0.57</u> | 1.00 | | | |
| SS | -0.35 | <u>-0.70</u> | 0.20 | <u>-0.63</u> | <u>-0.50</u> | 0.02 | <u>-0.62</u> | <u>-0.56</u> | <u>-0.49</u> | -0.34 | <u>-0.52</u> | -0.44 | 0.05 | -0.31 | <u>-0.85</u> | -0.33 | 1.00 | | |
| SV | <u>-0.70</u> | -0.28 | -0.12 | -0.20 | -0.29 | 0.12 | -0.20 | 0.00 | 0.07 | 0.16 | -0.23 | -0.22 | 0.45 | 0.08 | <u>-0.54</u> | -0.01 | <u>0.76</u> | 1.00 | |



Figura C II.10. Matriz de diagramas de dispersión de las variables de estudio en el Río Iro

La matriz de correlación resultante muestra como existe un gran número de correlaciones significativas entre las variables de estudio. Predominan claramente las correlaciones positivas sobre las negativas.

Entre las correlaciones positivas cabe destacar las siguientes:

- Amonio y nitritos, nitrógeno disuelto, fosfatos, fósforo, sílice, pigmentos fotosintéticos y formas de carbono.
- Nitritos con nitratos y nitrógeno disuelto, clorofila *a* y *b*, y carbono total e inorgánico.
- Nitrógeno disuelto con fosfatos, fósforo, silicatos, pigmentos y formas de carbono.
- Fosfatos con fósforo total, silicatos, pigmentos y formas de carbono.
- Fósforo total con silicatos, pigmentos, y formas de carbono.
- Sílice con clorofila *a*, carbono total y orgánico.
- Pigmentos fotosintéticos con formas de carbono.
- Sólidos en suspensión y sólidos volátiles.

Entre las correlaciones negativas cabe destacar la correlación negativa de los sólidos en suspensión con diversos nutrientes.

Como puede apreciarse, casi todos los nutrientes están correlacionados entre sí, y con otros parámetros relacionados con procesos de producción primaria como las diferentes formas de clorofila calculadas mediante el método tricromático.

En los apartados anteriores se representó numérica y gráficamente la influencia del efluente tratado de las aguas residuales de la estación depuradora de "El Torno" (Chiclana de la Frontera) en la calidad de las aguas del Río Iro. Este vertido aunque depurado, vierte un considerable caudal al medio acuático del estuario del Río Iro. A lo largo de su recorrido el vertido se va diluyendo con las aguas del sistema de marismas. Los altos niveles de nutrientes y otros contaminantes que se vierten permiten obtener un gran número de correlaciones significativas. Es lógico que éstas correlaciones presenten signo positivo y sean muy significativas puesto que el origen de los niveles de estos parámetros se debe mayoritariamente al vertido (no se han identificado otras fuentes de contaminación que puedan distorsionar los resultados).

Entre las correlaciones negativas se observa fundamentalmente la correlación existente entre los sólidos en suspensión y algunos nutrientes. En el apartado anterior se realizó una explicación acerca de la influencia de la marea respecto al material particulado y en suspensión. Esta explicación se comprueba mediante la matriz de correlación.

Por último, dentro de este apartado, se puede concluir que **la matriz de correlación explica perfectamente los fenómenos de contaminación-dilución del vertido de aguas residuales ocurrido en el Río Iro**. Estas conclusiones se complementan con las obtenidas con los diagramas de box-whiskers fundamentalmente en lo referente a la variabilidad espacial de los parámetros lo largo de l estuario.

4.3.4.2. ANÁLISIS CLUSTER EN EL ESTUARIO DEL RÍO IRO

En relación con el *análisis cluster* en el Río Iro, se han representado dos tipos de cluster:

- i. *Cluster de variables*, en el cual se realiza una clasificación de las variables de estudio. Se incluyen dos dendogramas, el primero en el cual se incluyen todas las variables (16 variables fisicoquímicas y 17 casos computados), y un segundo dendograma en el cual sólo se incluyen variables relativas a nutrientes (7 variables fisicoquímicas y 17 casos computados).
- ii. *Cluster de casos*, en el cual se realiza una clasificación de las estaciones de muestreo según la similitud de la calidad de sus aguas (16 variables fisicoquímicas 9 estaciones de muestreo

incluyendo Sancti Petri). También se incluyen dos dendogramas diferentes: el primero computado con 17 variables fisicoquímicas, y un segundo dendograma computados sólo con las variables relativas a nutrientes.

Las 16 variables fisicoquímicas fueron: pH, temperatura, salinidad, nitritos, nitratos, amonio, fosfatos, fósforo total, silicatos, carbono total disuelto, carbono orgánico disuelto, clorofila a, b y c, sólidos en suspensión y sólidos volátiles.

Las 7 variables relativas a nutrientes son: nitritos, nitratos, amonio, fosfatos, fósforo total, silicatos y carbono total disuelto.

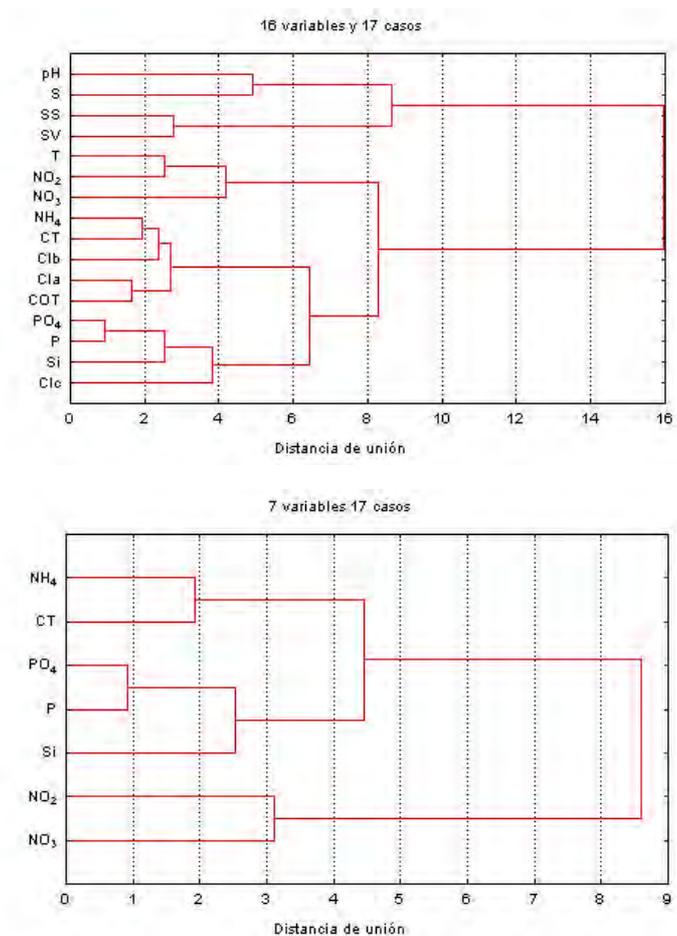


Figura C II.11. Dendogramas obtenidos del análisis cluster en el estuario del Río Iro

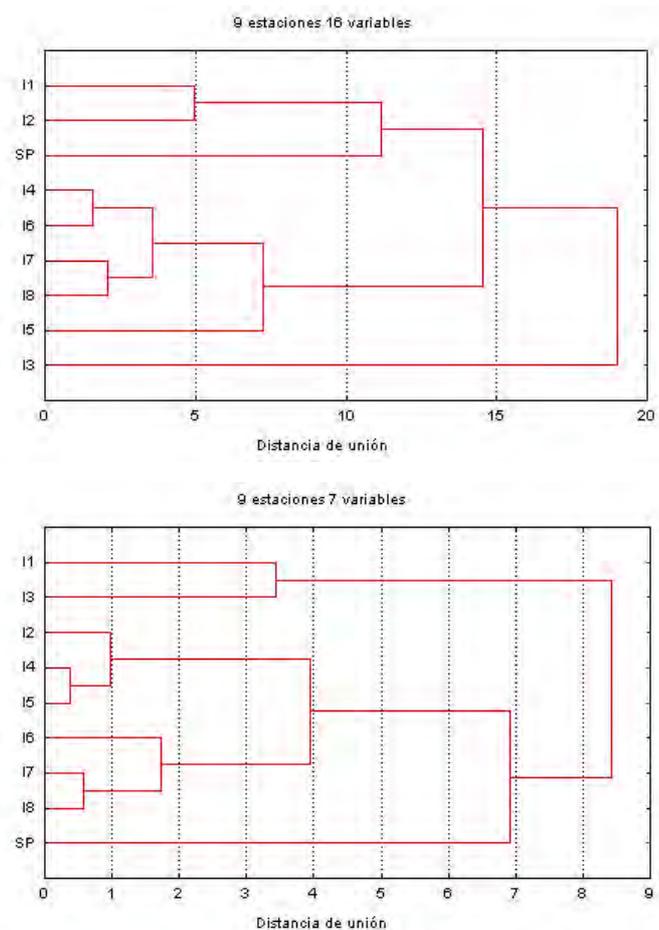


Figura C II.11. Dendogramas obtenidos del análisis cluster en el estuario del Río Iro (cont.)

En las dos grandes áreas litorales descritas en los apartados anteriores, ha sido posible corroborar algunos de los resultados obtenidos mediante otras técnicas de análisis de datos (p.e. matrices de correlación de Pearson).

De los dendogramas de variables se obtienen las siguientes asociaciones:

Dendograma de 16 variables.

Las primeras asociaciones más significativas que se producen son las siguientes:

- Fosfatos, fósforo total y sílice (junto con clorofila *c*).
- pH y salinidad.
- Sólidos en suspensión y volátiles.
- Carbono inorgánico
- Amonio, carbono total, carbono orgánico, clorofila *a* y *b*.
- Nitratos y nitritos.

Dendograma de 7 variables.

Las asociaciones que se producen son las siguientes:

- Nitritos y nitratos.
- Fosfatos, fósforo total y silicatos.
- Amonio y carbono total.

Posteriormente se forma un grupo entre el grupo del fósforo y el amonio y finalmente este grupo se une con el de los nitrógenos oxidados.

Debido a la alta correlación entre la mayoría de parámetros, a veces no es posible observar grupos de comportamiento entre parámetros. Algunas agrupaciones interesantes son la asociación entre los fósforos y sílice, y los sólidos las cuales se repiten en otras zonas ambientales. También se repiten los agrupamientos entre el amonio y el contenido en carbono, y el de nitritos y nitratos en ambos dendogramas. Ambos agrupamientos parecen ser razonable si pensamos que el vertido contiene un alto contenido en amonio y carbono por lo que pueden estar correlacionados. Los nitritos y nitratos son productos de la oxidación del amonio por tanto ambos también se agrupan en ambos dendogramas.

Dendograma de estaciones

En los dendogramas de estaciones las agrupaciones se realizan por similitud en la composición del agua.

En el diagrama construido considerando 16 variables físico-químicas se observan tres grupos de estaciones. Por un lado tenemos las **estaciones correspondientes a aguas arriba del vertido**, las cuales en un segundo agrupamiento se unirán a la estación de Sancti Petri. La segunda zona está formada por una única estación de muestreo, la **estación I3 localizada en el área de mezcla del vertido** y el medio receptor, y finalmente tenemos un tercer grupo formado por el **resto de estaciones del río**.

El dendograma construido a partir de los resultados de nutrientes establece una zonificación diferente. Por una parte, agrupa la estación I1 (la más interior) y a I3 (mezcla del vertido). Como segundo grupo, por una parte agrupa I2 junto con I4 e I5 (estaciones más próximas al vertido excluyendo I3), agrupa las dos estaciones del río más exteriores (I7 e I8), y finalmente agrupa a estas estaciones junto con I6 (de agua de calidad intermedia) en un gran grupo de estaciones.

Esta zonificación que realiza el análisis cluster es aproximadamente la que cabría esperar desde un punto de vista intuitivo considerando la posición del vertido y la morfología del estuario.

4.3.4.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES EN EL RÍO IRO

Al igual que para el análisis cluster, para la realización del PCA/FA se ha operado con las variables transformadas logarítmicamente y estandarizadas. Tras un análisis previo de componentes principales se ha realizado una rotación varimax de los factores iniciales.

Puesto que no se ha realizado el análisis de metales en el Río Iro, el PCA/FA de esta área ambiental se ha centrado en el análisis de nutrientes.

Las siguientes tablas muestran el número de autovalores/autovectores obtenidos en este análisis, así como la varianza explicada por cada uno de los factores, y la varianza total explicada. El número total de autovalores/autovectores utilizados en el PCA/FA se ha seleccionado siguiendo el criterio de algunos autores los cuales consideran todos aquellos autovalores/autovectores de valor mayor a 1.

Así pues, para 10 variables vemos como se obtienen 2 autovalores los cuales explican el 83,6% de la varianza total.

Tabla C II.55. Análisis factorial para 10 variables

| <i>Factor</i> | <i>Autovalores</i> | <i>% Varianza total</i> | <i>Autovalores acumulados</i> | <i>% Varianza acumulado</i> |
|---------------|--------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 6,760 | 67,600 | 6,760 | 67,600 |
| 2 | 1,601 | 16,008 | 8,361 | 83,609 |

Tabla C II.56. Factores obtenidos para 10 variables

| | <i>Factor 1</i> | <i>Factor 2</i> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Amonio</i> | <u>0,911</u> | 0,248 |
| <i>Nitritos</i> | 0,387 | <u>0,880</u> |
| <i>Nitratos</i> | -0,092 | <u>0,903</u> |
| <i>Nitrógeno disuelto</i> | <u>0,896</u> | 0,323 |
| <i>Fosfatos</i> | <u>0,956</u> | 0,079 |
| <i>Fósforo total</i> | <u>0,974</u> | 0,031 |
| <i>Sílice</i> | <u>0,774</u> | -0,052 |
| <i>Carbono total</i> | <u>0,841</u> | 0,375 |
| <i>Carbono inorgánico</i> | <u>0,705</u> | 0,487 |
| <i>Carbono orgánico</i> | <u>0,864</u> | 0,120 |
| Expl.Var | 6,203 | 2,158 |
| Prp.Totl | 0,620 | 0,216 |

El primer factor está formado por un gran número de variables: amonio, nitrógeno disuelto, fosfatos, fósforo total, sílice, carbono total, inorgánico y carbono orgánico.

El segundo factor está formado exclusivamente por dos factores.

Estos factores se identificaron como dos grandes grupos en el análisis cluster realizado para las variables relativas a nutrientes.

En apartados anteriores se ha comentado que las variables que se incluyen en el primer factor tienen su origen en las aguas residuales vertidas al Río Iro. Para las variables incluidas en el segundo factor, y fundamentalmente para los nitritos se realizó un extenso comentario explicando la transformación a estos en el medio natural a partir de amonio, y la posterior y última oxidación a nitratos.

Así pues y considerando las variables incluidas en ambos factores y resultados previos puede concluirse que **el primer factor indica la contaminación de las aguas del Río Iro por aguas residuales urbanas y el segundo factor indica procesos naturales en el medio de transformación química.**

4.4. RESULTADOS OBTENIDOS EN LA BAHÍA DE ALGECIRAS

4.4.1. RESULTADOS PROMEDIOS OBTENIDOS EN LAS ESTACIONES Y DE MUESTREO

Los resultados que se muestran a continuación son los resultados promedios de ocho muestreos realizados a lo largo del año 2001.

Como ya se comentó en el apartado de descripción de las zonas de estudio, en la Bahía de Algeciras se dispusieron tres transectos longitudinales a la bahía: dos de ellos situados próximos a costa, y un transecto central.

Para cada transecto se ha elaborado una tabla en la cual se resumen los resultados promedios de cada estación de muestreo. La última columna de cada tabla muestra los resultados promedios del transecto, excepto en el transecto Al 2 en el cual para realizar el promedio, se ha excluido la estación Al 2A la cual se sitúa en el punto de dilución del vertido de aguas residuales de una importante industria de la zona. Las elevadas concentraciones de algunas variables en esta estación de muestreo, podrían distorsionar el valor promedio del transecto.

Tabla C II.57. Promedio de las variables físico-químicas. Transecto AI1

| Parámetros \ Estaciones | AI 1A | AI 1B | AI 1C | AI 1D | AI 1E | AI1 |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------------|--------------|
| pH | 8,24 | 8,29 | 8,31 | 8,27 | 8,31 | 8,27 |
| Desv.Est. | 0,15 | 0,13 | 0,08 | 0,17 | --- | 0,12 |
| Temperatura (°C) | 17,5 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 17,5 |
| Desv.Est. | 2,6 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 2,6 |
| Salinidad | 34,5 | 33,3 | 33,3 | 32,8 | 29,2 | 33,4 |
| Desv.Est. | 6,6 | 4,0 | 3,3 | 2,5 | --- | 4,6 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,011 | < 0,002 | < 0,002 | < 0,002 | 0,772 | 0,072 |
| Desv.Est. | 0,018 | --- | --- | --- | --- | 0,221 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,015 | < 0,002 | < 0,002 | < 0,002 | 0,007 | 0,010 |
| Desv.Est. | 0,017 | --- | --- | 0,000 | --- | 0,014 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,390 | 0,048 | 0,080 | 0,071 | 0,076 | 0,267 |
| Desv.Est. | 0,176 | --- | --- | 0,015 | --- | 0,211 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | < 0,010 | < 0,010 | < 0,010 | < 0,010 | 0,302 | 0,024 |
| Desv.Est. | --- | --- | --- | --- | --- | 0,077 |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,018 | < 0,010 | 0,029 | 0,065 | 0,415 | 0,056 |
| Desv.Est. | 0,015 | --- | --- | 0,043 | --- | 0,111 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,088 | 0,035 | 0,049 | 0,027 | 0,247 | 0,083 |
| Desv.Est. | 0,078 | --- | --- | 0,022 | --- | 0,081 |
| Clorofila a (mg/m³) | 2,269 | n.d. | n.d. | 3,269 | n.d. | 2,380 |
| Desv.Est. | 1,548 | n.d. | n.d. | --- | n.d. | 1,486 |
| Clorofila b (mg/m³) | 0,310 | n.d. | n.d. | 0,324 | n.d. | 0,312 |
| Desv.Est. | 0,280 | n.d. | n.d. | --- | n.d. | 0,262 |
| Clorofila c (mg/m³) | 0,431 | n.d. | n.d. | 1,264 | n.d. | 0,524 |
| Desv.Est. | 0,347 | n.d. | n.d. | --- | n.d. | 0,427 |
| Carbono total (mg/L C) | 30,13 | 31,32 | 30,02 | 29,86 | 34,76 | 30,62 |
| Desv.Est. | 0,78 | --- | --- | --- | --- | 1,55 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 28,98 | 30,40 | 29,88 | 29,61 | 32,33 | 29,55 |
| Desv.Est. | 1,18 | --- | --- | --- | --- | 1,39 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 1,18 | 0,93 | 1,20 | 0,75 | 2,89 | 1,27 |
| Desv.Est. | 0,73 | --- | --- | --- | --- | 0,79 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 48,4 | 1,5 | < 0,0 | 3,5 | < 0,0 | 32,7 |
| Desv.Est. | 29,2 | --- | --- | --- | --- | 32,9 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 11,7 | 1,5 | < 0,0 | 1,8 | < 0,0 | 8,1 |
| Desv.Est. | 6,5 | --- | --- | --- | --- | 7,5 |

n.d.: no determinado

Tabla C II.58. Promedio de las variables físico-químicas. Transecto AI2

| Parámetros \ Estaciones | AI 2A | AI 2B | AI 2C | AI 2D | AI 2E | AI 2F | AI 2G | AI 2H | AI 2I | AI2 (*) |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| pH | 8,30 | 8,28 | 8,27 | 8,27 | 8,26 | 8,38 | 8,39 | 8,25 | 8,36 | 8,28 |
| Desv.Est. | 0,16 | 0,16 | 0,15 | 0,18 | 0,21 | --- | --- | 0,17 | --- | 0,14 |
| Temperatura (°C) | 17,6 | 16,7 | 17,4 | 16,4 | 16,3 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 16,9 |
| Desv.Est. | 2,4 | 2,5 | 3,3 | --- | --- | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 2,4 |
| Salinidad | 32,5 | 33,8 | 32,6 | 30,6 | 30,6 | 30,7 | 30,6 | 32,9 | 30,4 | 32,4 |
| Desv.Est. | 5,2 | 6,6 | 5,7 | --- | --- | --- | --- | 3,2 | --- | 4,6 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,185 | 0,009 | 0,010 | < 0,002 | 0,006 |
| Desv.Est. | 0,166 | 0,014 | 0,017 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 0,011 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,760 | 0,007 | 0,009 | 0,005 | 0,003 | < 0,002 | < 0,002 | < 0,002 | < 0,002 | 0,006 |
| Desv.Est. | 0,684 | 0,008 | 0,012 | 0,004 | 0,001 | --- | --- | --- | --- | 0,007 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 24,778 | 0,281 | 0,179 | 0,152 | 0,160 | 0,021 | < 0,002 | 0,039 | < 0,002 | 0,174 |
| Desv.Est. | 33,523 | 0,207 | 0,153 | 0,102 | 0,133 | --- | --- | 0,048 | --- | 0,167 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | < 0,010 |
| Desv.Est. | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,028 | 0,016 | 0,016 | 0,025 | 0,071 | < 0,010 | < 0,010 | 0,026 | < 0,010 | 0,023 |
| Desv.Est. | 0,016 | 0,010 | 0,008 | 0,014 | 0,037 | --- | --- | 0,024 | --- | 0,023 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,060 | 0,069 | 0,080 | 0,033 | 0,031 | 0,046 | 0,024 | 0,038 | 0,042 | 0,055 |
| Desv.Est. | 0,045 | 0,074 | 0,094 | 0,023 | 0,009 | --- | --- | 0,002 | --- | 0,062 |
| Clorofila a (mg/m³) | 0,759 | 1,727 | 2,093 | 1,522 | 1,707 | n.d. | n.d. | 3,453 | n.d. | 1,863 |
| Desv.Est. | 0,574 | 1,000 | 1,145 | 0,915 | 0,994 | n.d. | n.d. | --- | n.d. | 1,006 |
| Clorofila b (mg/m³) | 0,090 | 0,217 | 0,182 | 0,081 | 0,299 | n.d. | n.d. | 0,497 | n.d. | 0,232 |
| Desv.Est. | 0,110 | 0,155 | 0,177 | --- | 0,043 | n.d. | n.d. | --- | n.d. | 0,155 |
| Clorofila c (mg/m³) | 0,137 | 0,332 | 0,336 | 0,003 | 0,343 | n.d. | n.d. | 0,670 | n.d. | 0,336 |
| Desv.Est. | 0,111 | 0,172 | 0,199 | --- | 0,040 | n.d. | n.d. | --- | n.d. | 0,187 |
| Carbono total (mg/L C) | 29,63 | 29,65 | 29,31 | 28,84 | 28,94 | 29,18 | 29,19 | 28,87 | 29,11 | 29,23 |
| Desv.Est. | 0,67 | 0,73 | 0,69 | 0,93 | 0,83 | --- | --- | --- | --- | 0,72 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 28,54 | 28,67 | 28,37 | 28,36 | 28,38 | 29,49 | 30,11 | 29,20 | 29,00 | 28,65 |
| Desv.Est. | 1,24 | 0,78 | 1,02 | 0,72 | 0,51 | --- | --- | --- | --- | 0,81 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 1,30 | 1,07 | 1,04 | 0,89 | 0,92 | 0,36 | 0,60 | 0,44 | 0,56 | 0,92 |
| Desv.Est. | 0,63 | 0,59 | 0,67 | 0,40 | 0,36 | --- | --- | --- | --- | 0,52 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 44,1 | 48,4 | 47,4 | 33,8 | 2,5 | 4,0 | 3,5 | < 0,0 | 5,0 | 36,4 |
| Desv.Est. | 24,0 | 29,2 | 29,4 | 46,3 | --- | --- | --- | --- | --- | 31,6 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 12,7 | 13,6 | 13,0 | 8,3 | 2,5 | 4,0 | 3,5 | < 0,0 | 4,5 | 10,5 |
| Desv.Est. | 5,9 | 7,3 | 6,4 | 10,3 | --- | --- | --- | --- | --- | 7,4 |

(*) No se incluye en el promedio del transecto, los valores obtenidos en la estación AI 2A
n.d.: no determinado

Tabla C II.59. Promedio de las variables físico-químicas. Transecto AI3

| Parámetros \ Estaciones | AI 3A | AI 3B | AI 3C | AI 3D | AI 3E | AI 3 |
|---|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| pH | 8,26 | 8,36 | 8,37 | 8,38 | 8,26 | 8,29 |
| Desv.Est. | 0,17 | --- | --- | --- | 0,18 | 0,14 |
| Temperatura (°C) | 17,5 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 17,5 |
| Desv.Est. | 2,4 | n.d. | n.d. | n.d. | n.d. | 2,4 |
| Salinidad | 34,0 | 30,6 | 30,8 | 30,9 | 33,3 | 32,9 |
| Desv.Est. | 6,2 | --- | --- | --- | 3,7 | 4,5 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,014 | < 0,002 | < 0,002 | < 0,002 | < 0,002 | 0,010 |
| Desv.Est. | 0,023 | --- | --- | --- | --- | 0,019 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,005 | < 0,002 | < 0,002 | < 0,002 | < 0,002 | 0,004 |
| Desv.Est. | 0,004 | --- | --- | --- | --- | 0,003 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,388 | 0,078 | 0,002 | 0,035 | 0,007 | 0,249 |
| Desv.Est. | 0,416 | --- | --- | --- | 0,007 | 0,368 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | < 0,010 | < 0,010 | < 0,010 | < 0,010 | 0,012 | < 0,010 |
| Desv.Est. | --- | --- | --- | --- | 0,010 | --- |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,022 | 0,011 | 0,382 | < 0,010 | 0,028 | 0,049 |
| Desv.Est. | 0,015 | --- | --- | --- | 0,034 | 0,101 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,063 | 0,027 | 0,025 | 0,044 | 0,029 | 0,051 |
| Desv.Est. | 0,062 | --- | --- | --- | 0,006 | 0,050 |
| Clorofila a (mg/m³) | 1,946 | n.d. | n.d. | n.d. | 4,278 | 2,205 |
| Desv.Est. | 1,531 | n.d. | n.d. | n.d. | --- | 1,629 |
| Clorofila b (mg/m³) | 0,265 | n.d. | n.d. | n.d. | 0,579 | 0,304 |
| Desv.Est. | 0,205 | n.d. | n.d. | n.d. | --- | 0,220 |
| Clorofila c (mg/m³) | 0,372 | n.d. | n.d. | n.d. | 1,080 | 0,461 |
| Desv.Est. | 0,278 | n.d. | n.d. | n.d. | --- | 0,359 |
| Carbono total (mg/L C) | 29,70 | 30,92 | 29,47 | 29,50 | 29,68 | 29,77 |
| Desv.Est. | 0,81 | --- | --- | --- | --- | 0,74 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 28,82 | 29,83 | 29,11 | 28,99 | 29,52 | 29,02 |
| Desv.Est. | 0,87 | --- | --- | --- | --- | 0,75 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 1,04 | 1,27 | 0,51 | 0,46 | 0,55 | 0,92 |
| Desv.Est. | 0,78 | --- | --- | --- | --- | 0,66 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 47,5 | < 0,0 | 8,5 | 2,0 | < 0,0 | 32,6 |
| Desv.Est. | 28,9 | --- | --- | --- | --- | 32,0 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 12,9 | < 0,0 | 8,5 | 2,0 | < 0,0 | 9,5 |
| Desv.Est. | 6,4 | --- | --- | --- | --- | 7,5 |

n.d.: no determinado

Tabla C II.60. Promedio de las variables físico-químicas. BAHÍA DE ALGECIRAS

| Datos | AL 1 | AL 2 | AL 3 | Bahía de Algeciras |
|---|--------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| PARÁMETROS FÍSICO QUÍMICOS | | | | |
| pH | 8,27 | 8,28 | 8,29 | 8,28 |
| Desv.Est. | 0,12 | 0,14 | 0,14 | 0,13 |
| Temperatura (°C) | 17,5 | 16,9 | 17,5 | 17,2 |
| Desv.Est. | 2,6 | 2,4 | 2,4 | 2,4 |
| Salinidad | 33,4 | 32,4 | 32,9 | 32,8 |
| Desv.Est. | 4,6 | 4,6 | 4,5 | 4,5 |
| Amonio (mg/L N-NH₄) | 0,072 | 0,006 | 0,010 | 0,022 |
| Desv.Est. | 0,221 | 0,011 | 0,019 | 0,106 |
| Nitritos (mg/L N-NO₂) | 0,010 | 0,006 | 0,004 | 0,007 |
| Desv.Est. | 0,014 | 0,007 | 0,003 | 0,009 |
| Nitratos (mg/L N-NO₃) | 0,267 | 0,174 | 0,249 | 0,215 |
| Desv.Est. | 0,211 | 0,167 | 0,368 | 0,239 |
| Fosfatos (mg/L P-PO₄) | 0,024 | < 0,010 | < 0,010 | 0,011 |
| Desv.Est. | 0,077 | --- | --- | 0,011 |
| Fósforo total (mg/L P) | 0,056 | 0,023 | 0,049 | 0,038 |
| Desv.Est. | 0,111 | 0,023 | 0,101 | 0,077 |
| Silicatos (mg/L Si) | 0,083 | 0,055 | 0,051 | 0,061 |
| Desv.Est. | 0,081 | 0,062 | 0,050 | 0,065 |
| Clorofila a (mg/m³) | 2,380 | 1,863 | 2,205 | 2,061 |
| Desv.Est. | 1,486 | 1,006 | 1,629 | 1,268 |
| Clorofila b (mg/m³) | 0,312 | 0,232 | 0,304 | 0,271 |
| Desv.Est. | 0,262 | 0,155 | 0,220 | 0,201 |
| Clorofila c (mg/m³) | 0,524 | 0,336 | 0,461 | 0,417 |
| Desv.Est. | 0,427 | 0,187 | 0,359 | 0,312 |
| Carbono total (mg/L C) | 30,62 | 29,23 | 29,77 | 29,68 |
| Desv.Est. | 1,55 | 0,72 | 0,74 | 1,11 |
| Carbono inorgánico (mg/L C) | 29,55 | 28,65 | 29,02 | 28,96 |
| Desv.Est. | 1,39 | 0,81 | 0,75 | 1,02 |
| Carbono orgánico (mg/L C) | 1,27 | 0,92 | 0,92 | 1,01 |
| Desv.Est. | 0,79 | 0,52 | 0,66 | 0,63 |
| Sólidos en suspensión (mg/L) | 32,7 | 36,4 | 32,6 | 34,4 |
| Desv.Est. | 32,9 | 31,6 | 32,0 | 31,4 |
| Sólidos volátiles (mg/L) | 8,1 | 10,5 | 9,5 | 9,6 |
| Desv.Est. | 7,5 | 7,4 | 7,5 | 7,4 |
| Dureza cálcica (mg/L CaCO₃) | --- | --- | --- | --- |
| Desv.Est. | | | | |

(*) No se incluye en el promedio del transecto, los valores obtenidos en la estación AI 2A

4.4.2. ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS TRANSECTOS DE LA BAHÍA DE ALGECIRAS

La estadística descriptiva de los transectos de la Bahía de Algeciras se ha realizado mediante el paquete estadístico Statistica 6,0 (StatSoft, 1997).

Con objeto de obtener resultados representativos, los parámetros seleccionados para este análisis estadístico son aquellos que se han determinado con más frecuencia y en todas las estaciones de muestreo. Estos son:

- pH
- Temperatura
- Salinidad
- Amonio
- Nitritos
- Nitratos
- Fosfatos
- Fósforo total
- Silicatos
- Clorofila *a*
- Clorofila *b*
- Clorofila *c*
- Carbono disuelto
- Carbono inorgánico disuelto
- Carbono orgánico disuelto
- Sólidos en suspensión
- Sólidos volátiles

Tabla C II.61. Estudio estadístico del transecto AI1 de la Bahía de Algeciras

| AI 1 | N Válidos | IntConf. -95% | Media | IntConf. +95% | Desv. Est. | Mediana | Mínimo | Máximo | Cuartil Inferior | Cuartil Superior | Varianza |
|---------------------------------------|--------------|------------------|-------|------------------|---------------|---------|--------|--------|---------------------|---------------------|----------|
| pH | 13 | 8,19 | 8,27 | 8,34 | 0,12 | 8,26 | 8,06 | 8,43 | 8,17 | 8,38 | 1,50E-02 |
| T (°C) | 5 | 14,3 | 17,5 | 20,8 | 2,6 | 19,0 | 14,3 | 19,9 | 15,1 | 19,5 | 5,77E+00 |
| S | 9 | 32,1 | 34,7 | 37,3 | 3,3 | 35,7 | 30,5 | 40,7 | 31,0 | 36,0 | 2,13E+01 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 12 | -0,069 | 0,072 | 0,212 | 0,221 | 0,002 | 0,002 | 0,772 | 0,002 | 0,011 | 2,90E-02 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 13 | 0,002 | 0,010 | 0,019 | 0,014 | 0,004 | 0,002 | 0,053 | 0,002 | 0,014 | 0,00E+00 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 13 | 0,139 | 0,267 | 0,394 | 0,211 | 0,246 | 0,048 | 0,665 | 0,080 | 0,387 | 5,70E-02 |
| ΣN (mg/L N) | 13 | 0,179 | 0,343 | 0,508 | 0,272 | 0,264 | 0,052 | 0,855 | 0,084 | 0,550 | 7,80E-02 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 15 | -0,019 | 0,024 | 0,067 | 0,077 | 0,001 | 0,001 | 0,302 | 0,001 | 0,010 | 4,00E-03 |
| P total (mg/L P) | 13 | -0,011 | 0,056 | 0,123 | 0,111 | 0,017 | 0,009 | 0,415 | 0,009 | 0,034 | 8,00E-03 |
| Silicatos (mg/L Si-SiO ₄) | 13 | 0,034 | 0,083 | 0,132 | 0,081 | 0,047 | 0,011 | 0,247 | 0,035 | 0,100 | 9,00E-03 |
| Clorofila a (mg/m ³) | 9 | 1,238 | 2,380 | 3,522 | 1,486 | 2,360 | 0,352 | 5,056 | 1,069 | 3,269 | 1,78E+00 |
| Clorofila b (mg/m ³) | 9 | 0,110 | 0,312 | 0,513 | 0,262 | 0,273 | 0,001 | 0,858 | 0,136 | 0,424 | 1,73E-01 |
| Clorofila c (mg/m ³) | 9 | 0,196 | 0,524 | 0,852 | 0,427 | 0,375 | 0,022 | 1,264 | 0,290 | 0,856 | 8,81E-02 |
| CT (mg/L C) | 11 | 29,59 | 30,62 | 31,66 | 1,55 | 30,18 | 29,09 | 34,76 | 29,85 | 31,17 | 2,39E+00 |
| CI (mg/L C) | 11 | 28,62 | 29,55 | 30,48 | 1,39 | 29,79 | 27,44 | 32,33 | 28,34 | 30,40 | 1,92E+00 |
| COT (mg/L C) | 11 | 0,74 | 1,27 | 1,80 | 0,79 | 0,93 | 0,37 | 2,89 | 0,75 | 1,93 | 6,25E-01 |
| SS (mg/L) | 12 | 11,8 | 32,7 | 53,6 | 32,9 | 22,7 | 0,0 | 80,0 | 0,8 | 66,0 | 1,08E+03 |
| SV (mg/L) | 12 | 3,3 | 8,1 | 12,9 | 7,5 | 8,2 | 0,0 | 21,5 | 0,8 | 13,8 | 5,62E+01 |

Tabla C II.62. Estudio estadístico del transecto AI2 (*) de la Bahía de Algeciras

| AI 2 | N Válidos | IntConf. -95% | Media | IntConf. +95% | Desv. Est. | Mediana | Mínimo | Máximo | Cuartil Inferior | Cuartil Superior | Varianza |
|---------------------------------------|--------------|------------------|-------|------------------|---------------|---------|--------|--------|---------------------|---------------------|----------|
| pH | 20 | 8,22 | 8,28 | 8,35 | 0,14 | 8,36 | 8,10 | 8,49 | 8,13 | 8,39 | 1,85E-02 |
| T (°C) | 11 | 15,3 | 16,9 | 18,5 | 2,4 | 16,3 | 14,0 | 21,3 | 15,2 | 18,8 | 5,90E+00 |
| S | 18 | 29,3 | 31,4 | 33,4 | 4,2 | 31,6 | 23,2 | 37,8 | 30,6 | 34,5 | 2,15E+01 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 28 | 0,002 | 0,006 | 0,010 | 0,011 | 0,002 | 0,002 | 0,046 | 0,002 | 0,002 | 2,00E-04 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 28 | 0,003 | 0,006 | 0,009 | 0,007 | 0,003 | 0,001 | 0,029 | 0,002 | 0,005 | 1,00E-03 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 27 | 0,108 | 0,174 | 0,240 | 0,167 | 0,074 | 0,002 | 0,575 | 0,047 | 0,321 | 1,23E+00 |
| ΣN (mg/L N) | 28 | 0,112 | 0,180 | 0,248 | 0,176 | 0,077 | 0,006 | 0,583 | 0,051 | 0,317 | 1,26E+00 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 31 | 0,002 | 0,004 | 0,007 | 0,007 | 0,001 | 0,001 | 0,030 | 0,001 | 0,005 | 0,00E+00 |
| P total (mg/L P) | 25 | 0,014 | 0,023 | 0,033 | 0,023 | 0,015 | 0,009 | 0,113 | 0,009 | 0,031 | 4,00E-04 |
| Silicatos (mg/L Si-SiO ₄) | 28 | 0,031 | 0,055 | 0,080 | 0,062 | 0,035 | 0,011 | 0,251 | 0,024 | 0,045 | 9,10E-03 |
| Clorofila a (mg/m ³) | 21 | 1,405 | 1,863 | 2,321 | 1,006 | 2,050 | 0,224 | 3,724 | 1,260 | 2,276 | 9,27E-01 |
| Clorofila b (mg/m ³) | 16 | 0,150 | 0,232 | 0,315 | 0,155 | 0,228 | 0,000 | 0,497 | 0,115 | 0,342 | 2,04E-02 |
| Clorofila c (mg/m ³) | 16 | 0,236 | 0,336 | 0,435 | 0,187 | 0,290 | 0,003 | 0,687 | 0,236 | 0,406 | 2,88E-02 |
| CT (mg/L C) | 25 | 28,93 | 29,23 | 29,53 | 0,72 | 29,18 | 27,60 | 30,48 | 28,87 | 29,70 | 5,25E-01 |
| CI (mg/L C) | 23 | 28,30 | 28,65 | 29,00 | 0,81 | 28,77 | 27,05 | 30,11 | 28,08 | 29,16 | 6,62E-01 |
| COT (mg/L C) | 23 | 0,70 | 0,92 | 1,15 | 0,52 | 0,84 | 0,09 | 2,26 | 0,56 | 1,22 | 2,70E-01 |
| SS (mg/L) | 22 | 22,4 | 36,4 | 50,4 | 31,6 | 24,8 | 0,0 | 78,0 | 3,5 | 66,5 | 9,86E+02 |
| SV (mg/L) | 22 | 7,2 | 10,5 | 13,8 | 7,4 | 11,3 | 0,0 | 25,0 | 3,5 | 17,0 | 5,26E+01 |

(Estadística realizada excluyendo la estación AI 2A)

Tabla C II.63. Estudio estadístico del transecto AI 3 de la Bahía de Algeciras

| AI 3 | <i>N</i> Válidos | <i>IntConf.</i> -95% | <i>Media</i> | <i>IntConf.</i> +95% | <i>Desv.</i> <i>Est.</i> | <i>Mediana</i> | <i>Mínimo</i> | <i>Máximo</i> | <i>Cuartil</i> <i>Inferior</i> | <i>Cuartil</i> <i>Superior</i> | <i>Varianza</i> |
|---------------------------------------|---------------------|-------------------------|--------------|-------------------------|-----------------------------|----------------|---------------|---------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| pH | 11 | 8,19 | 8,29 | 8,39 | 0,14 | 8,36 | 8,05 | 8,49 | 8,13 | 8,38 | 2,10E-02 |
| T (°C) | 5 | 14,6 | 17,5 | 20,4 | 2,4 | 18,5 | 14,6 | 20,1 | 15,5 | 19,0 | 4,95E+00 |
| S | 10 | 29,6 | 33,0 | 36,3 | 4,7 | 33,0 | 24,1 | 41,4 | 30,6 | 35,5 | 2,39E+01 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 13 | -0,002 | 0,010 | 0,021 | 0,019 | 0,002 | 0,002 | 0,059 | 0,002 | 0,002 | 0,00E+00 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 13 | 0,002 | 0,004 | 0,006 | 0,003 | 0,002 | 0,002 | 0,011 | 0,002 | 0,005 | 0,00E+00 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 13 | 0,027 | 0,249 | 0,471 | 0,368 | 0,078 | 0,002 | 1,108 | 0,035 | 0,245 | 9,20E-02 |
| ΣN (mg/L N) | 13 | 0,039 | 0,263 | 0,486 | 0,369 | 0,082 | 0,006 | 1,113 | 0,039 | 0,298 | 9,30E-02 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 16 | 0,002 | 0,006 | 0,009 | 0,007 | 0,001 | 0,001 | 0,022 | 0,001 | 0,008 | 0,00E+00 |
| P total (mg/L P) | 13 | -0,012 | 0,049 | 0,110 | 0,101 | 0,015 | 0,004 | 0,382 | 0,009 | 0,040 | 7,00E-03 |
| Silicatos (mg/L Si-SiO ₄) | 13 | 0,020 | 0,051 | 0,081 | 0,050 | 0,033 | 0,011 | 0,198 | 0,025 | 0,048 | 3,00E-03 |
| Clorofila a (mg/m ³) | 9 | 0,952 | 2,205 | 3,457 | 1,629 | 1,260 | 0,247 | 4,895 | 1,153 | 3,357 | 1,56E+00 |
| Clorofila b (mg/m ³) | 8 | 0,121 | 0,304 | 0,488 | 0,220 | 0,286 | 0,000 | 0,579 | 0,133 | 0,509 | 2,89E-02 |
| Clorofila c (mg/m ³) | 8 | 0,161 | 0,461 | 0,761 | 0,359 | 0,360 | 0,065 | 1,080 | 0,191 | 0,720 | 4,53E-02 |
| CT (mg/L C) | 11 | 29,27 | 29,77 | 30,27 | 0,74 | 29,68 | 28,34 | 30,92 | 29,28 | 30,54 | 5,49E-01 |
| CI (mg/L C) | 11 | 28,51 | 29,02 | 29,53 | 0,75 | 29,11 | 27,74 | 29,98 | 28,19 | 29,81 | 5,68E-01 |
| COT (mg/L C) | 11 | 0,47 | 0,92 | 1,36 | 0,66 | 0,60 | 0,17 | 2,46 | 0,51 | 1,36 | 4,38E-01 |
| SS (mg/L) | 12 | 12,2 | 32,6 | 52,9 | 32,0 | 22,7 | 0,0 | 81,0 | 1,0 | 63,0 | 1,02E+03 |
| SV (mg/L) | 12 | 4,7 | 9,5 | 14,2 | 7,5 | 9,9 | 0,0 | 20,0 | 1,0 | 16,3 | 5,59E+01 |

Tabla C II.64. Estudio estadístico de la Bahía de Algeciras

| Bahía de Algeciras | <i>N</i> Válidos | <i>IntConf.</i> -95% | <i>Media</i> | <i>IntConf.</i> +95% | <i>Desv.</i> <i>Est.</i> | <i>Mediana</i> | <i>Mínimo</i> | <i>Máximo</i> | <i>Cuartil</i> <i>Inferior</i> | <i>Cuartil</i> <i>Superior</i> | <i>Varianza</i> |
|---------------------------------------|---------------------|-------------------------|--------------|-------------------------|-----------------------------|----------------|---------------|---------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------|
| pH | 44 | 8,24 | 8,28 | 8,32 | 0,13 | 8,36 | 8,05 | 8,49 | 8,14 | 8,38 | 1,77E-02 |
| T (°C) | 21 | 16,1 | 17,2 | 18,3 | 2,4 | 16,4 | 14,0 | 21,3 | 15,2 | 19,0 | 5,46E+00 |
| S | 38 | 31,2 | 32,6 | 33,9 | 4,2 | 33,0 | 23,2 | 41,4 | 30,6 | 35,6 | 2,16E+01 |
| Amonio (mg/L N-NH ₄) | 53 | -0,007 | 0,022 | 0,051 | 0,106 | 0,002 | 0,002 | 0,772 | 0,002 | 0,002 | 7,20E-03 |
| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | 54 | 0,004 | 0,007 | 0,009 | 0,009 | 0,002 | 0,001 | 0,053 | 0,002 | 0,005 | 6,00E-04 |
| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | 53 | 0,149 | 0,215 | 0,281 | 0,239 | 0,113 | 0,002 | 1,108 | 0,054 | 0,321 | 6,46E-01 |
| ΣN (mg/L N) | 54 | 0,168 | 0,239 | 0,310 | 0,261 | 0,138 | 0,006 | 1,113 | 0,052 | 0,357 | 6,80E-01 |
| Fosfatos (mg/L P-PO ₄) | 62 | 0,000 | 0,009 | 0,019 | 0,038 | 0,001 | 0,001 | 0,302 | 0,001 | 0,005 | 1,00E-03 |
| P total (mg/L P) | 51 | 0,017 | 0,038 | 0,060 | 0,077 | 0,015 | 0,004 | 0,415 | 0,009 | 0,034 | 3,90E-03 |
| Silicatos (mg/L Si-SiO ₄) | 54 | 0,043 | 0,061 | 0,079 | 0,065 | 0,039 | 0,011 | 0,251 | 0,025 | 0,049 | 7,40E-03 |
| Clorofila a (mg/m ³) | 39 | 1,650 | 2,061 | 2,472 | 1,268 | 2,050 | 0,224 | 5,056 | 1,153 | 2,858 | 1,56E+00 |
| Clorofila b (mg/m ³) | 33 | 0,200 | 0,271 | 0,343 | 0,201 | 0,273 | 0,000 | 0,858 | 0,136 | 0,419 | 7,73E-02 |
| Clorofila c (mg/m ³) | 33 | 0,307 | 0,417 | 0,528 | 0,312 | 0,320 | 0,003 | 1,264 | 0,237 | 0,605 | 8,84E-02 |
| CT (mg/L C) | 47 | 29,36 | 29,68 | 30,01 | 1,11 | 29,50 | 27,60 | 34,76 | 29,06 | 30,18 | 1,24E+00 |
| CI (mg/L C) | 45 | 28,66 | 28,96 | 29,27 | 1,02 | 28,99 | 27,05 | 32,33 | 28,20 | 29,61 | 1,04E+00 |
| COT (mg/L C) | 45 | 0,82 | 1,01 | 1,20 | 0,63 | 0,84 | 0,09 | 2,89 | 0,56 | 1,25 | 4,00E-01 |
| SS (mg/L) | 46 | 25,1 | 34,4 | 43,8 | 31,4 | 23,8 | 0,0 | 81,0 | 2,5 | 66,5 | 9,82E+02 |
| SV (mg/L) | 46 | 7,4 | 9,6 | 11,8 | 7,4 | 10,3 | 0,0 | 25,0 | 2,0 | 16,0 | 5,30E+01 |

4.4.3. HISTOGRAMAS DE FRECUENCIAS. DIAGRAMAS DE DATOS ORDENADOS. DIAGRAMAS DE BOX-WHISKERS.

Se han representado los histogramas de frecuencia, diagramas de datos ordenados y diagramas de box-whiskers de las variables más importantes medidas en la Bahía de Algeciras. Para la elaboración de los histogramas se han seguido las directrices marcadas por la *Guía para la evaluación de la calidad de los datos* publicada por la Oficina de Investigación y Desarrollo de la USEPA (USEPA, 1998).

La primera clase (Clase 0) de cada parámetro está formada por aquellas observaciones cuyos resultados han resultado inferiores a los límites de detección de los métodos analíticos.

Los histogramas de frecuencia se han dividido en 10 clases principales de intervalos regulares de concentración seleccionados en función del rango de concentraciones de cada parámetro. Aquellas variables cuyos rangos de concentraciones se encuentran en el rango calculado en la Ría de Huelva, Bahía de Cádiz y Río Iro, se han mantenido los mismos intervalos de clases. Para aquellas variables cuyo rango de concentraciones es muy distinto, se han seleccionado nuevos intervalos de clase acordes con las concentraciones.

Las variables que mantienen los mismos intervalos que las anteriores zonas ambientales son:

Intervalos de la Ría de Huelva y Bahía de Cádiz:

- = Amonio
- = Nitritos

Intervalos de la Bahía de Cádiz:

- = Fosfatos
- = Fósforo

Las variables que cambian los intervalos de clases son las siguientes:

- ≠ Nitratos (hacia niveles superiores)
- ≠ Nitrógeno (hacia niveles superiores)
- ≠ Sílice (hacia niveles inferiores)
- ≠ Sólidos en suspensión (hacia niveles inferiores)
- ≠ Carbono orgánico (hacia niveles superiores)

Las consideraciones que se han realizado para la elaboración de estos diagramas en relación con los criterios de selección de clases, expresión de las variables, diseño de los diagramas de cajas y bigotes, y la expresión que definen los valores extremos y los valores anómalos son los mismos que los comentados para las anteriores áreas ambientales.

La única consideración especial que se hace, es la eliminación de la estación AI 2A con objeto de que no distorsione los resultados globales de la bahía.

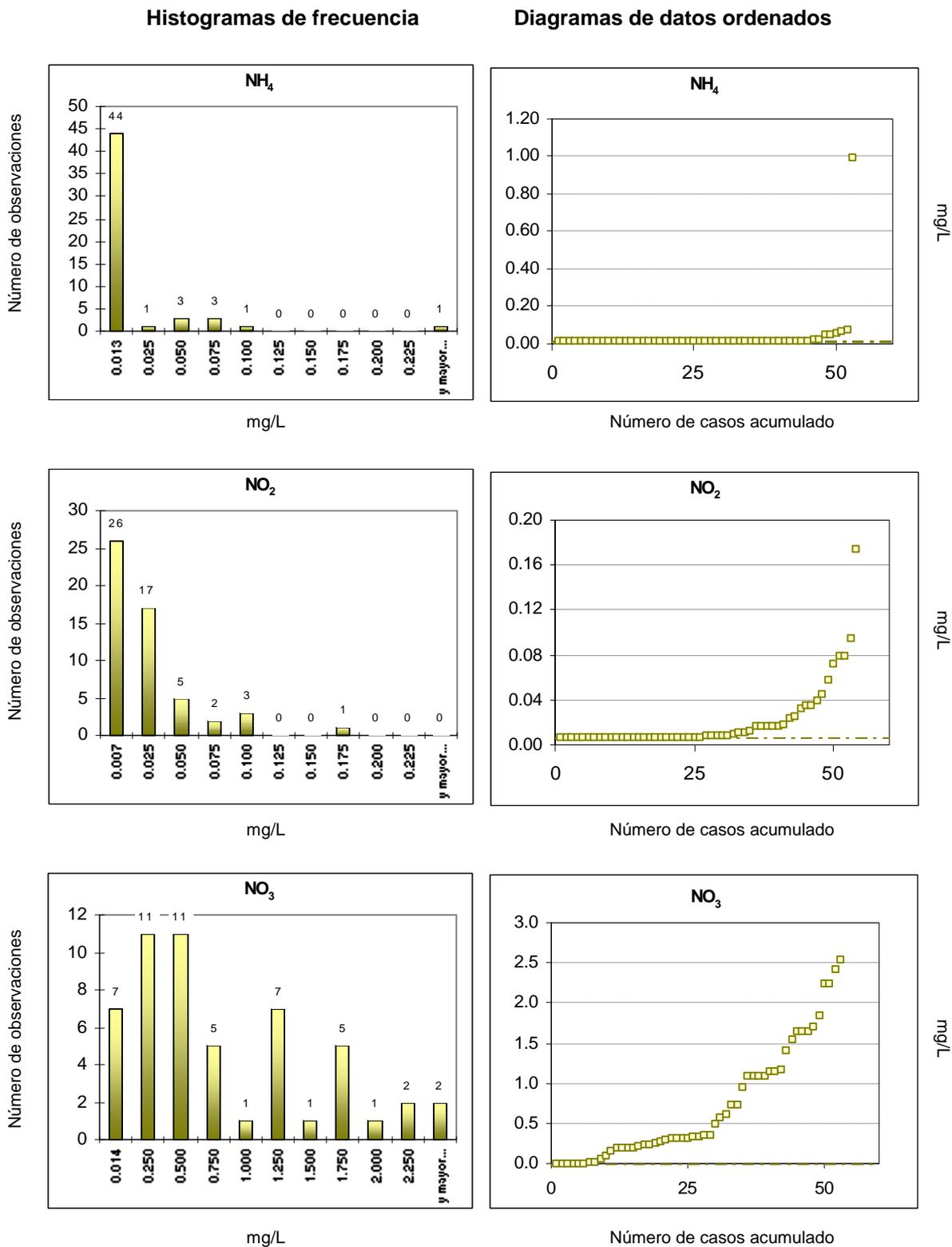


Figura C II.12.
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE ALGECIRAS

Diagramas de Box-Whisker

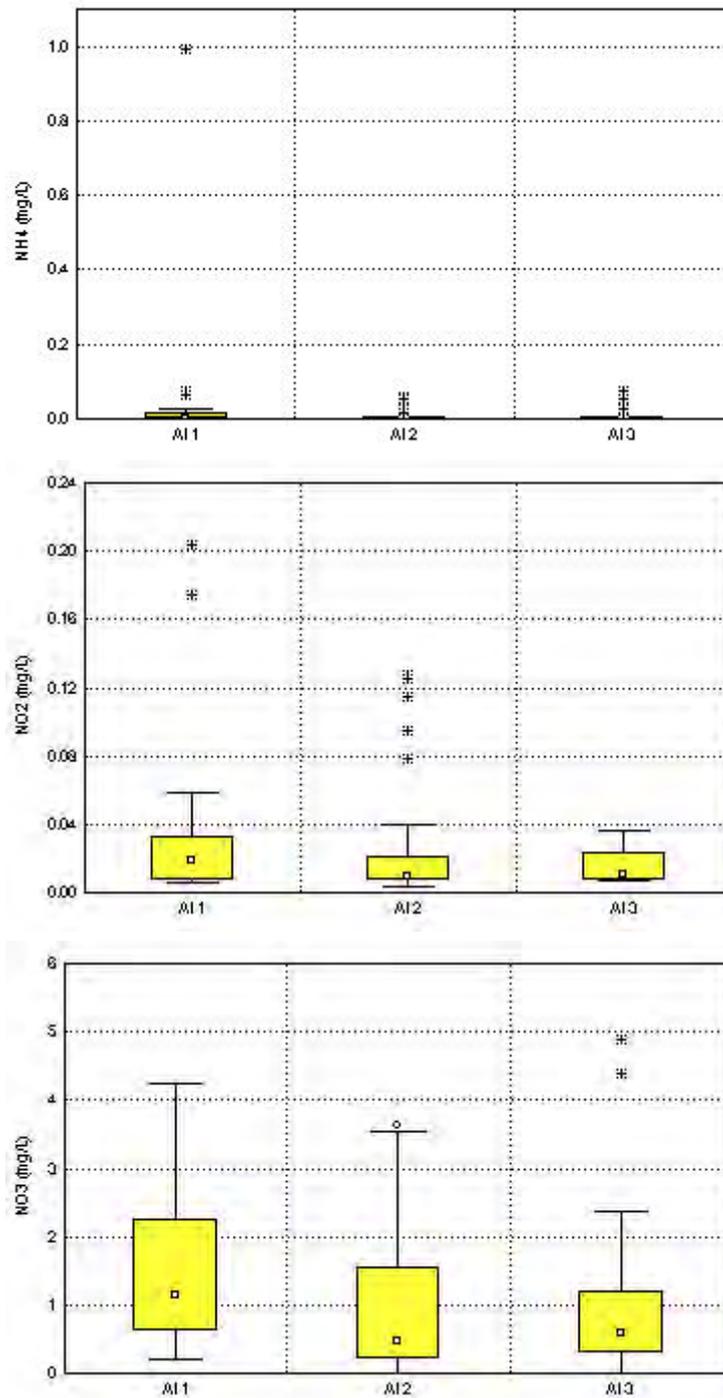


Figura C II.12. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE ALGECIRAS

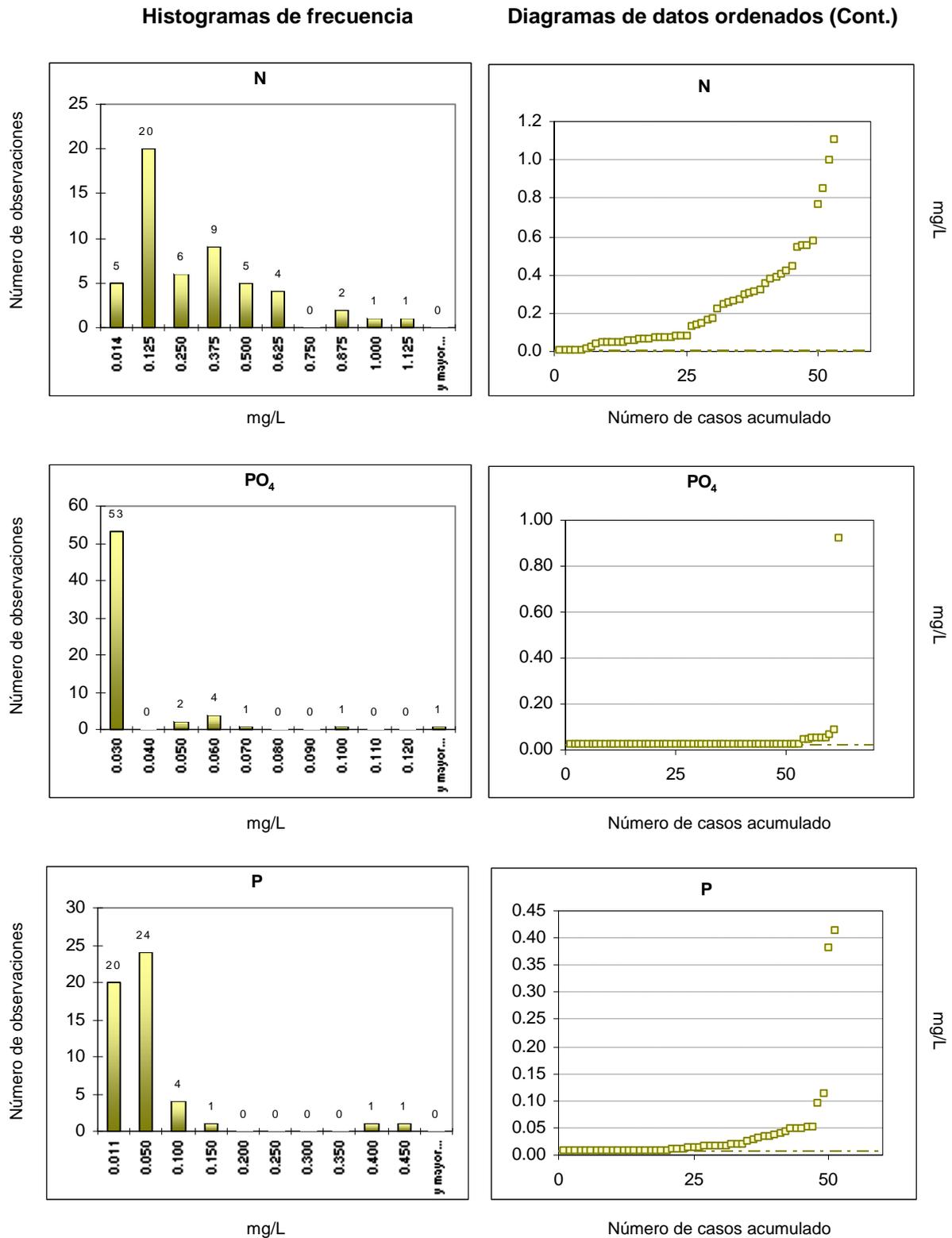


Figura C II.12. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE ALGECIRAS

Diagramas de Box-Whisker (Cont.)

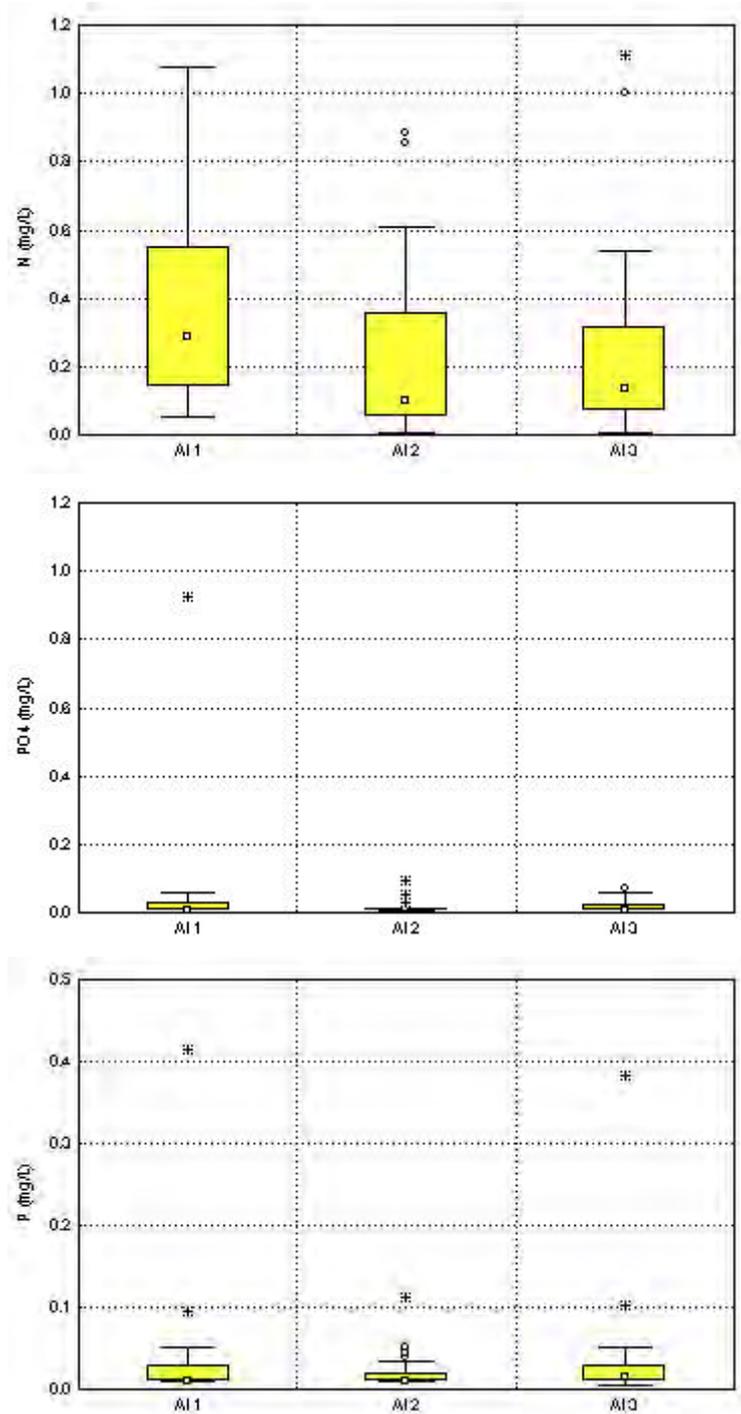


Figura C II.12. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE ALGECIRAS

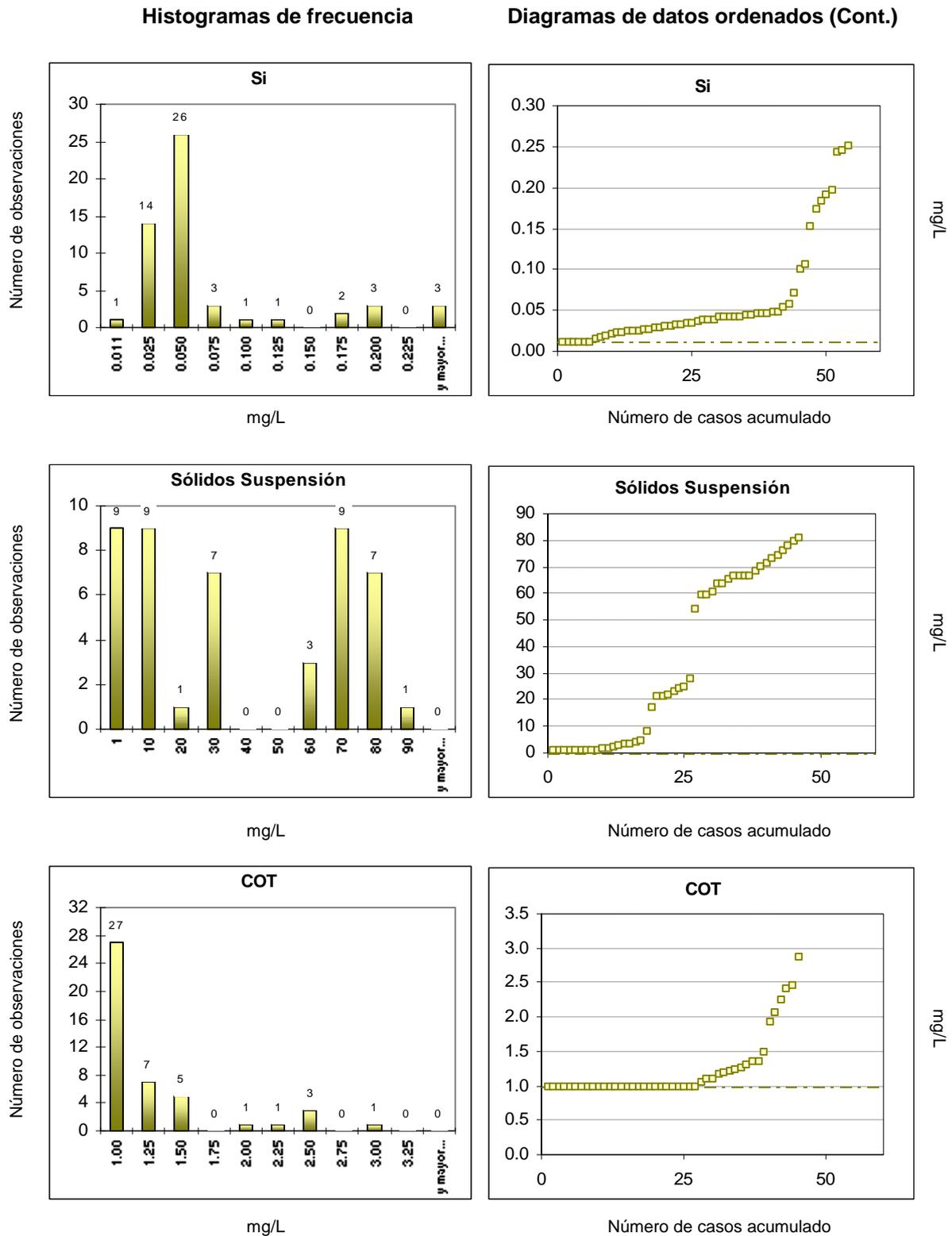


Figura C II.12.
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE ALGECIRAS

Diagramas de Box-Whisker (Cont.)

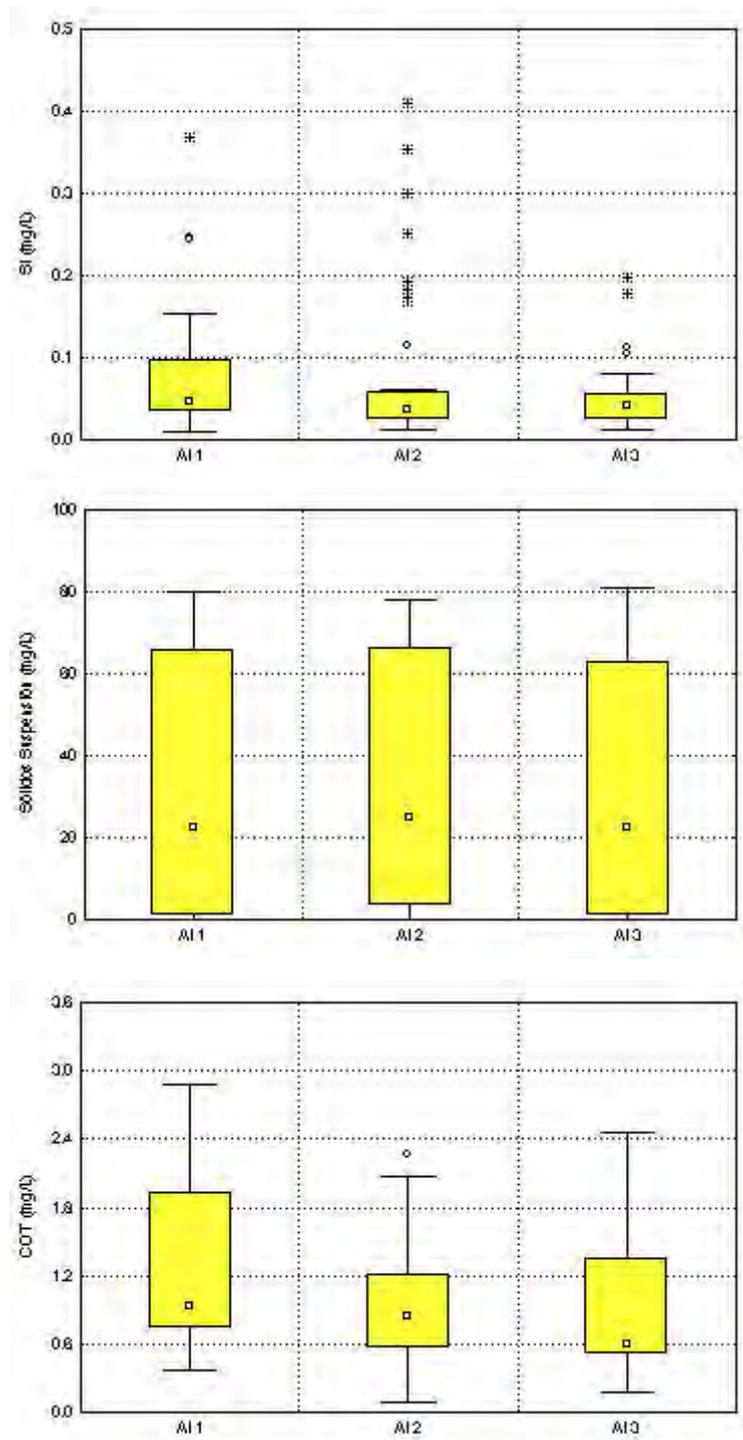


Figura C II.12. (cont.)
Histogramas de frecuencia. Diagramas de datos ordenados. Diagramas box-whisker.
BAHÍA DE ALGECIRAS

AMONIO

El histograma de frecuencia del parámetro *amonio* se ha construido a partir de un total de 53 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 25 $\mu\text{g/L}$ NH_4^+ . La clase-0 incluye a todas las observaciones inferiores a 13 $\mu\text{g/L}$. La clase-10 incluye todas aquellas observaciones superiores a 225 $\mu\text{g/L}$. Como se puede apreciar gráficamente, para esta área ambiental existe un porcentaje muy elevado de observaciones no detectadas (83%), es decir que han presentado una concentración de amonio inferior a 13 $\mu\text{g/L}$ NH_4^+ . Para el resto de clases vemos que existen un gran número de éstas que no presentan ninguna observación, siendo la clase que define los valores mayores a 225 $\mu\text{g/L}$ la que cierra el histograma con una observación (AI 1E= 722 $\mu\text{g/L}$).

El diagrama de datos ordenados muestra el **alto porcentaje de valores no-detectados**. Sólo en el último extremo de la curva se muestran los valores detectados los cuales se corresponden en la mayoría con las estaciones situadas próximas a la desembocadura de los ríos Palmones y Guadarranque, y como valor destacado la concentración de amonio obtenida en la estación situada próxima a una de las bocanas del puerto de Algeciras (AI 1E).

En los diagramas de box-whiskers se observan claramente los **bajos contenidos de amonio en la Bahía de Algeciras**. El alto porcentaje de muestras en las cuales no se ha podido detectar amonio hace que aquellas estaciones en las que sí se detectan aparezcan éstos como valores anómalos y valores extremos (tres en AI 1, siete en AI 2, cuatro en AI 3).

NITRITOS

El histograma de frecuencias para la representación de *nitritos* se ha construido a partir de 54 casos clasificados en 10 clases de intervalos de 25 $\mu\text{g/L}$ NO_2^- cada una. La clase-0 está definida por una concentración de 7 $\mu\text{g/L}$ NO_2^- la cual es el límite de detección de este método analítico, e incluye 26 **casos no-detectados** los cuales se corresponden con el 48% de las observaciones. El 80% de los casos se encuentran por debajo de 25 $\mu\text{g/L}$, y el 98% está por debajo de 100 $\mu\text{g/L}$.

En el diagrama de box-whiskers se detectan dos valores extremos en el transecto AI 1 y cinco en el transecto AI 2. En el transecto 1 estos valores se corresponden con la estación AI 1A próxima a la desembocadura del río Palmones. En el transecto AI 2, las estaciones que representan estos valores extremos son las estaciones AI 2B y AI 2C, próximas al polígono industrial de la localidad de Los Barrios y próxima a Gibraltar respectivamente.

NITRATOS

Los intervalos de clases para esta área ambiental han tenido que ampliarse debido a las **altas concentraciones de nitratos de las aguas de la Bahía de Algeciras**. Así, se ha construido el histograma de frecuencias a partir de 53 casos distribuidos en clases de 250 $\mu\text{g/L}$ excepto la clase-0 de 9 $\mu\text{g/L}$ que recoge las observaciones no detectadas (7 observaciones). La clase-2 correspondiente a los primeros 500 $\mu\text{g/L}$ incluye al 55% de las observaciones, la clase-5 de 1250 $\mu\text{g/L}$ resume el 79% y finalmente el 96% de las observaciones presentan menos de 2250 $\mu\text{g/L}$.

En el diagrama de box-whiskers se observan sólo 1 valor anómalo (AI 1A) en AI 1 y dos valores extremos en AI 3 (los dos en AI 3A). Notar que mientras que la distribución de valores en amonio y nitritos detectaba gran número de valores extremos, con nitratos sólo aparecen tres.

Respecto a la forma, se observan cajas de más de 1 mg/L de amplitud y whiskers superiores de aproximadamente 2 mg/L . Esto significa una gran variabilidad espacial y temporal de este parámetro.

NITRÓGENO

Respecto a este parámetro, y considerando lo visto anteriormente, tenemos que tener en cuenta que el parámetro nitratos es la especie de nitrógeno predominante en la bahía. La siguiente tabla lo muestra:

| Datos | AI 1 | AI 2 | AI 3 | Bahía de Algeciras |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|--------------------|
| Promedio de N-NH ₄ (mg/L) | 0,072 | 0,006 | 0,01 | 0,022 |
| Promedio de N-NO ₂ (mg/L) | 0,01 | 0,006 | 0,004 | 0,007 |
| Promedio de N-NO ₃ (mg/L) | 0,267 | 0,174 | 0,249 | 0,215 |
| Σ Promedio N (mg/L) | 0,349 | 0,186 | 0,263 | 0,244 |
| % N-NH ₄ | 20,6 | 3,2 | 3,8 | 9,0 |
| % N-NO ₂ | 2,9 | 3,2 | 1,5 | 2,9 |
| % N-NO ₃ | 76,5 | 93,5 | 94,7 | 88,1 |
| % ΣN | 100,0 | 100,0 | 100,0 | 100,0 |

En el caso de la Bahía de Algeciras se observa como **los nitratos es la especie predominante llegando alcanzar porcentajes tan altos como un 95%** en el transecto AI 3. Si bien en el transecto AI 1 el porcentaje de nitratos es muy alto, en cantidades relativas está muy por debajo de los determinados en los otros transectos. Esto es debido a que AI 1 está muy condicionado a los valores obtenidos en las estaciones próximas al puerto de Algeciras. Los altos porcentajes de amonio posiblemente sean debidos a la presencia de vertidos de aguas residuales procedentes de la ciudad la cual no cuenta actualmente con estación depuradora de aguas residuales.

El histograma de frecuencias para la representación de *nitrógeno* se ha construido en intervalos de 125 µg/L excepto la clase-0 de 14 µg/L la cual incluye cinco observaciones no detectadas. Estos valores no-detectados se localizan en estaciones situadas en la zona central de la bahía. El 58% de las observaciones están incluidas en los primeros 250 µg/L., el 75% en los primeros 375 µg/L, y el 96% por debajo de 875 µg/L.

En relación con la forma de la distribución de puntos, vemos como la curva toma una forma cóncava suave, esto es, presenta una cierta simetría los resultados pero con una tendencia hacia altas concentraciones.

En los diagramas de box-whiskers se identifican dos valores anómalos en AI 2 (AI 2B y AI 2C) y un valor anómalo y otro extremo en AI 3 (ambos en AI 3A).

FOSFATOS

El histograma de frecuencia del parámetro *fosfatos* se ha construido a partir de 62 casos y en los mismos intervalos de clases que los seleccionados para Cádiz debido al bajo contenido de fósforo medido en todo el conjunto de la Bahía de Algeciras. Estos bajos contenidos se muestran claramente en la Clase-0 la cual recoge todas las observaciones inferiores a 30 µg/L PO₄³⁻. El 85% de los casos está incluida en esta clase. Finalmente, el 95% de las observaciones se localizan en los primeros 60 µg/L PO₄³⁻.

El diagrama de datos ordenados muestra el alto porcentaje de valores no-detectados. Sólo en el último extremo de la curva se muestran los valores detectados los cuales se corresponden en la mayoría con las estaciones situadas próximas a la desembocadura de los ríos Palmones y Guadarranque, y como valor destacado la concentración de fosfatos obtenida en la estación situada próxima a una de las bocanas del puerto de Algeciras.

En los diagramas de box-whiskers se observan claramente los **bajos niveles de fosfatos en la Bahía de Algeciras**. En el transecto AI 1 se detecta un valor extremo correspondiente a la estación AI 1E, 4 extremos y 2 anómalos en AI 2 (estaciones AI 2B y AI 2C) y 1 valor anómalo de AI 3 (AI 3A).

FÓSFORO

El histograma de frecuencia del parámetro *fósforo total* se ha construido a partir de un total de 57 casos divididos en clases de intervalos de concentración de 50 µg/L P (mismos intervalos que para la Bahía de Cádiz). Para este parámetro el 39% de las observaciones no han detectado fósforo en las agua. Por debajo de 50 µg/L P se encuentran el 86% de las observaciones y por debajo de 150 µg/L P se resume el 96% de las mediciones de fósforo realizadas en la Bahía de Algeciras.

El diagrama de datos ordenados muestra aproximadamente la misma forma que los fosfatos, sólo que existen un mayor número de observaciones detectadas. Finalmente, en el extremo derecho del diagrama se muestran dos valores de concentración muy alta con respecto al resto de valores obtenidos en la bahía. Estos dos puntos se corresponden con las estaciones AI 1E y AI 3C las cuales se corresponden con la zona de influencia del puerto de Algeciras y de la ciudad de Gibraltar respectivamente.

Los diagramas de box-whisker muestran las **bajas concentraciones de fósforo** medidas en los tres transectos de la Bahía de Algeciras. Existen varias observaciones detectadas como concentraciones anómalas o extremas. En AI 1 dos valores extremos (AI 1D y AI 1E); en AI 2 se detectan 4 anómalos y 1 extremo (localizados en la mayoría en las estaciones más exteriores); y en AI 3 dos valores extremos (AI 3A y AI 3C).

SILICATOS

El histograma de frecuencia del parámetro *silicatos* se ha construido a partir de un total de 54 casos divididos en 10 clases principales de intervalos de concentración de 25 µg/L Si. Para esta área ambiental ha habido que bajar los intervalos de concentración de las clases debido a los bajos niveles de sílice medidos en la bahía. Por debajo de 50 µg/L Si se encuentra el 76% de las observaciones y por debajo de 200 µg/L Si el 94% de las observaciones.

Tanto en el histograma de frecuencias como en el diagrama de datos ordenados se observa como existen dos grupos de valores, un grupo que se corresponde con un conjunto de valores bajos, inferiores a 50 µg/L y un segundo grupo de valores entre 50 y 250 mg/L. La identificación de las estaciones de muestreo a las cuales pertenecen estos valores, no aporta ninguna información. La única explicación lógica es la estacionalidad del parámetro lo que hace que varíe a lo largo del año. No hay que olvidar que este es un nutriente esencial para muchos tipos de organismos (p.e. diatomeas) típicos de aguas costeras.

En AI 1 se detectan 2 valores anómalos (AI 1A y AI 1E) y 1 extremo (AI 1A); en AI 2 se detecta 1 valor anómalo y 8 extremos (repartidas entre las estaciones AI 2B y AI 2C); y en AI 3 se detectan 2 anómalos y 2 extremos (todas en AI 3A).

SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN

Para este parámetro se ha construido el histograma de frecuencias para un total de 46 casos. Las clases se han tenido que seleccionar en intervalos de concentraciones inferiores a los elegidos para el resto de áreas ambientales. Así tenemos clases divididas en intervalos de 10 mg/L con la distribución de porcentajes de casos siguiente. Un 20% de las observaciones se han computado como no detectadas, el 57% es inferior a 30 mg/L, el 83% es inferior a 70 mg/L, y finalmente el 98% de las observaciones no han superado los 80 mg/L.

En el diagrama de datos ordenados se observan tres zonas diferenciadas en la nube de puntos. Una zona inferior correspondiente en la mayoría de los casos con las observaciones no detectadas; una zona intermedia entre 20 y 30 mg/L; y una superior entre 60 y 80 mg/L. La localización de las estaciones de muestreo en cualquiera de estas tres zonas no aporta ninguna información acerca de una posible

variabilidad espacial ya que las estaciones se repiten en las tres zonas de la nube de resultados. Posiblemente exista una variabilidad temporal de este parámetro.

Esta posible estacionalidad se observa en las cajas de box-whiskers mostrándose como cajas amplias. Se observa como la forma y distribución de valores es muy homogénea en los tres transectos. Tanto las cajas como los whiskers de los tres transectos presentan una forma y tamaño similar. La mediana en los tres transectos se localiza aproximadamente en los 20 mg/L. Por tanto, este parámetro presenta niveles muy homogéneos en toda la bahía.

COT

El histograma del parámetro *carbono orgánico* se ha construido a partir de un total de 45 casos distribuidos en clases de 1 mg/L, intervalo inferior al resto de áreas ambientales. En términos de porcentaje se observa un 60% de los casos por debajo del límite de detección medio establecido de 1 mg/L. El 76% de las observaciones se encuentran por debajo de los 1,25 mg/L y finalmente, el 98% por debajo de 2,5 mg/L.

El diagrama de datos ordenados muestra dos zonas diferenciadas, una inferior que resume el gran número de observaciones no detectadas, y una segunda zona de gran pendiente la cual significa una gran variabilidad entre las observaciones detectadas. Esta variabilidad es relativa puesto que aunque se muestra una gran pendiente, el intervalo que comprende es pequeño. Espacialmente no es posible hacer una clasificación de estos dos grupos de medidas puesto que las estaciones se repiten en ambos.

Puesto que el límite de detección prefijado ha sido un límite de detección medio para las cuatro áreas ambientales, el diagrama de box-whisker muestra valores inferiores a 1 mg/L. Las representaciones muestran cajas y whiskers proporcionados lo que apuntan a una distribución normal de los resultados. En el caso de AI 2 se detecta un valor anómalo situado en la estación AI 2C.

4.4.4. MATRIZ DE CORRELACIÓN. ANÁLISIS CLUSTER. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES.

Al igual que se realizó con las anteriores áreas ambientales, mediante el paquete informático Statistica 6.0 (StatSoft Inc. 1997) se ha computado la matriz de correlación de las variables estudiadas en la Bahía de Algeciras además de un análisis cluster y el análisis de componentes principales y análisis factorial de las variables. Además, se ha realizado el cluster de las estaciones de muestreo con objeto de zonificar las aguas de la Bahía de Algeciras.

4.4.4.1. MATRIZ DE CORRELACIÓN DE PEARSON

Se ha realizado la *matriz de correlación* de Pearson de las variables físico-químicas más estudiadas en la Bahía de Algeciras. Para esta área ambiental el número de casos computados ha sido N=12. Las correlaciones significativas ($p < 0,05$) están marcadas en color y subrayado: las correlaciones positivas en subrayado y color azul oscuro, y las negativas en subrayado y color rojo oscuro.

Tabla C II.65. Matriz de correlaciones de las variables en la Bahía de Algeciras

| | pH | T | S | NH ₄ | NO ₂ | NO ₃ | SN | PO ₄ | P | Si | Cl a | Cl b | Cl c | CT | Cl | COT | SS | SV | |
|-----------------|-------|--------------|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|--------------|--------------|-------|-------------|-------|-------------|--------------|-------|-------------|------|--|
| PH | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| T | 0,25 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| S | 0,27 | -0,37 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| NH ₄ | 0,05 | -0,67 | 0,32 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | | |
| NO ₂ | -0,33 | -0,60 | 0,33 | 0,42 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | | |
| NO ₃ | -0,46 | 0,29 | -0,59 | -0,22 | 0,11 | 1,00 | | | | | | | | | | | | | |
| SN | -0,47 | 0,22 | -0,56 | -0,14 | 0,17 | 1,00 | 1,00 | | | | | | | | | | | | |
| PO ₄ | -0,22 | -0,58 | 0,84 | 0,35 | 0,56 | -0,39 | -0,36 | 1,00 | | | | | | | | | | | |
| P | 0,31 | 0,18 | 0,53 | -0,39 | -0,16 | -0,54 | -0,58 | 0,37 | 1,00 | | | | | | | | | | |
| Si | 0,07 | -0,67 | 0,29 | 0,84 | 0,69 | -0,06 | 0,02 | 0,32 | -0,40 | 1,00 | | | | | | | | | |
| Cl a | -0,05 | 0,63 | -0,78 | -0,55 | -0,52 | 0,50 | 0,45 | -0,75 | -0,12 | -0,51 | 1,00 | | | | | | | | |
| Cl b | -0,18 | -0,28 | -0,23 | 0,05 | 0,10 | 0,50 | 0,51 | -0,14 | -0,15 | 0,06 | 0,20 | 1,00 | | | | | | | |
| Cl c | -0,19 | -0,08 | -0,38 | -0,06 | -0,10 | 0,65 | 0,65 | -0,31 | -0,27 | -0,02 | 0,42 | 0,93 | 1,00 | | | | | | |
| CT | -0,04 | -0,42 | 0,32 | 0,52 | 0,73 | 0,05 | 0,11 | 0,46 | 0,09 | 0,57 | -0,40 | 0,28 | 0,04 | 1,00 | | | | | |
| Cl | -0,45 | 0,10 | 0,02 | -0,18 | 0,40 | 0,26 | 0,26 | 0,30 | 0,35 | -0,17 | 0,07 | 0,14 | -0,01 | 0,61 | 1,00 | | | | |
| COT | 0,43 | -0,33 | -0,06 | 0,62 | 0,04 | 0,02 | 0,07 | -0,24 | -0,60 | 0,65 | -0,15 | 0,18 | 0,24 | 0,05 | -0,71 | 1,00 | | | |
| SS | 0,08 | 0,76 | -0,11 | -0,61 | -0,41 | 0,25 | 0,19 | -0,15 | 0,11 | -0,61 | 0,29 | -0,42 | -0,21 | -0,38 | 0,08 | -0,33 | 1,00 | | |
| SV | -0,15 | 0,56 | -0,56 | -0,27 | -0,27 | 0,52 | 0,49 | -0,50 | -0,52 | -0,23 | 0,30 | -0,30 | -0,07 | -0,35 | -0,12 | 0,06 | 0,66 | 1,00 | |

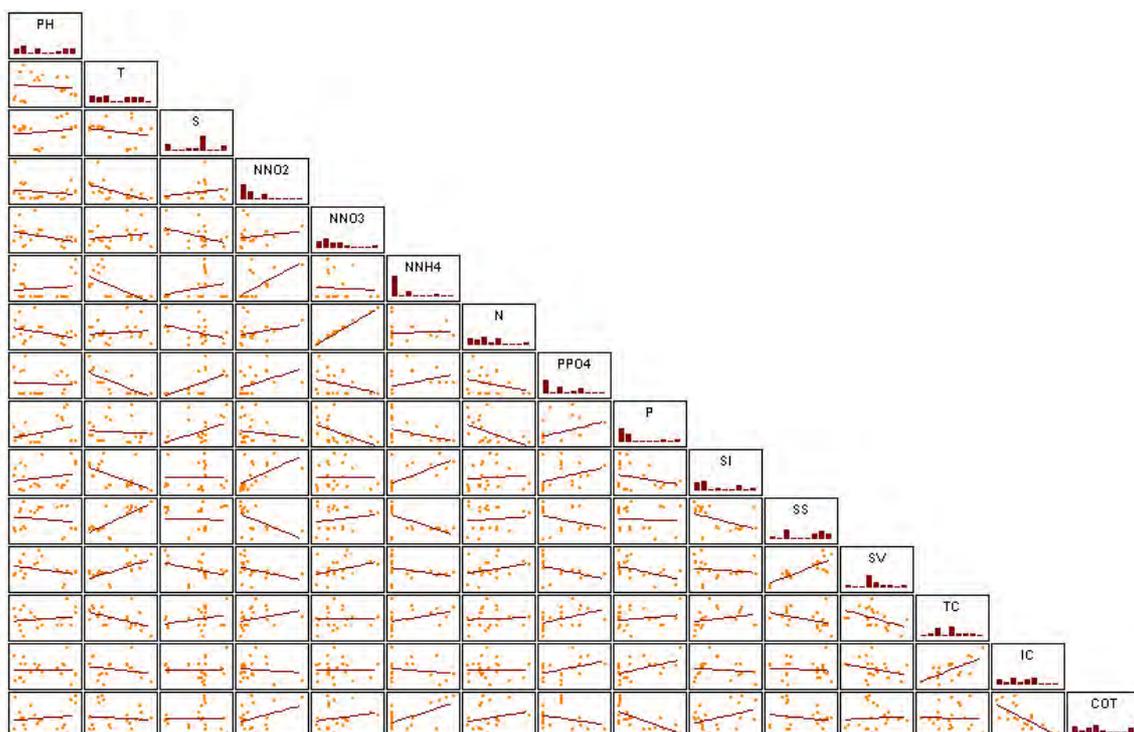


Figura C II.13. Matriz de diagramas de dispersión de las variables de estudio en la Bahía de Algeciras

La matriz de correlación resultante muestra un **escaso número de correlaciones positivas y negativas** entre las variables de estudio que caracterizan la Bahía de Algeciras. El bajo número de casos computables ($N=12$) hace que los coeficientes significativos tengan que ser muy altos, y por tanto para el nivel de confianza fijado ($p<0,05$) muchos parámetros correlacionados en las anteriores áreas ambientales, están en el límite de significación. Este es el ejemplo de los nitratos, los cuales se han correlacionado con el fósforo total en las anteriores áreas ambientales. Como ya hemos visto anteriormente y se muestra en la correlación *nitrógeno disuelto-nitrato*, la especie dominante de nitrógeno en esta bahía son los nitratos. Observando la matriz de Pearson se comprueba que la correlación de nitratos con fósforo total no aparece como significativa (-0.54) mientras que la de nitrógeno disuelto sí se correlaciona con fósforo (-0.58). Puede apreciarse la similitud entre los valores de los coeficientes y el hecho de que uno sea significativo y el otro no.

Relativo a este ejemplo, hay que reflexionar también acerca del signo de la correlación. Las correlaciones entre estos parámetros en Huelva y Cádiz han sido positivas, y de una forma u otra se ha explicado un posible origen para ambos (vertidos de alto contenido en nitrógeno y fósforo que al llegar al agua se diluyen por procesos de mezcla). En el apartado anterior se comentó los bajos contenidos de fósforo en las aguas de la Bahía de Algeciras siendo los niveles sólo apreciables en zonas muy próximas a fuentes de contaminación (Puerto de Algeciras, y desembocaduras del Palmones y Guadarranque principalmente). Posiblemente, **en términos globales exista un déficit de fósforo en las aguas de la Bahía de Algeciras y las pocas cantidades disponibles se utilicen en la producción primaria junto con otros nutrientes esenciales estando estos procesos limitados en estas aguas. El nitrógeno sin embargo, no actúa de limitante en el sistema y sigue llegando a las aguas procedentes de vertidos, escorrentías u otras fuentes.**

Lo comentado respecto a la producción primaria se hace patente en los valores de los coeficientes positivos entre las diferentes tipos de clorofilas y los nitratos. Nuevamente estos coeficientes son altos y se encuentran en el límite de la significancia. Para clorofila *a* y *b* no son significativos (0,5 en ambos casos) y para clorofila *c* sí es significativo (0,65). En esta misma línea, es muy importante la correlación negativa entre los fosfatos y la clorofila *a* con un coeficiente negativo bastante alto (-0.75)

Otras correlaciones importantes de citar son:

- Existe una correlación muy significativa y positiva entre los valores de sílice con amonio y sílice con nitritos.
- Correlación significativa y positiva entre los sólidos en suspensión y volátiles.

Por último, dentro de este apartado, se puede concluir que **la matriz de correlación explica fenómenos de limitación de nutrientes en la Bahía de Algeciras**. Estos fenómenos podrían ser mejor explicados teniendo mayor número de casos con los que se pudiera operar.

4.3.4.2. ANÁLISIS CLUSTER DE LA BAHÍA DE ALGECIRAS

En relación con el *análisis cluster* en la Bahía de Algeciras, se han representado dos tipos de cluster:

- i. *Cluster de variables*, en el cual se realiza una clasificación de las variables de estudio. Se incluyen dos dendogramas, el primero en el cual se incluyen todas las variables (16 variables fisicoquímicas y 14 casos computados), y un segundo dendograma en el cual sólo se incluyen variables relativas a nutrientes (7 variables fisicoquímicas y 14 casos computados).
- ii. *Cluster de casos*, en el cual se realiza una clasificación de las estaciones de muestreo según la similitud de la calidad de sus aguas (14 variables fisicoquímicas 18 estaciones de muestreo). También se incluyen dos dendogramas diferentes: el primero computado con 17 variables

físicoquímicas, y un segundo dendograma computados sólo con las variables relativas a nutrientes.

Las 16 variables físicoquímicas fueron: pH, temperatura, salinidad, nitritos, nitratos, amonio, fosfatos, fósforo total, silicatos, carbono total disuelto, carbono orgánico disuelto, clorofila a, b y c, sólidos en suspensión y sólidos volátiles.

Las 7 variables relativas a nutrientes son: nitritos, nitratos, amonio, fosfatos, fósforo total, silicatos y carbono total disuelto.

Hay que especificar que debido a la distorsión en el análisis que puede ejercer los resultados de la estación Al 2A, se han suprimido los valores de ésta para el análisis cluster de variables pero si se mantiene para el análisis cluster de estaciones de muestreo, no para el de transectos.

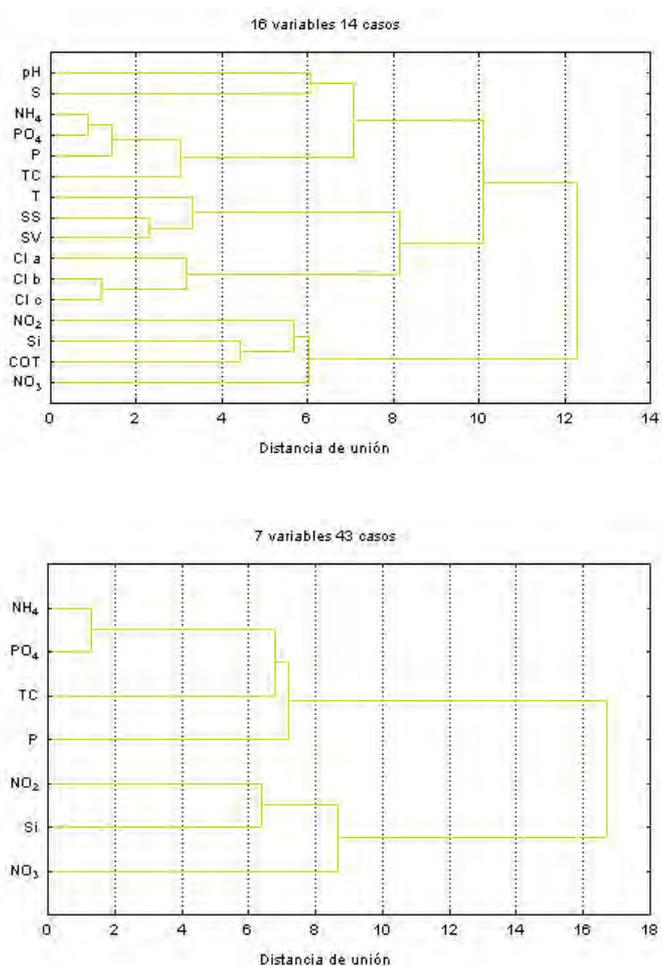


Figura C II.14. Dendogramas obtenidos del análisis cluster en la Bahía de Algeciras

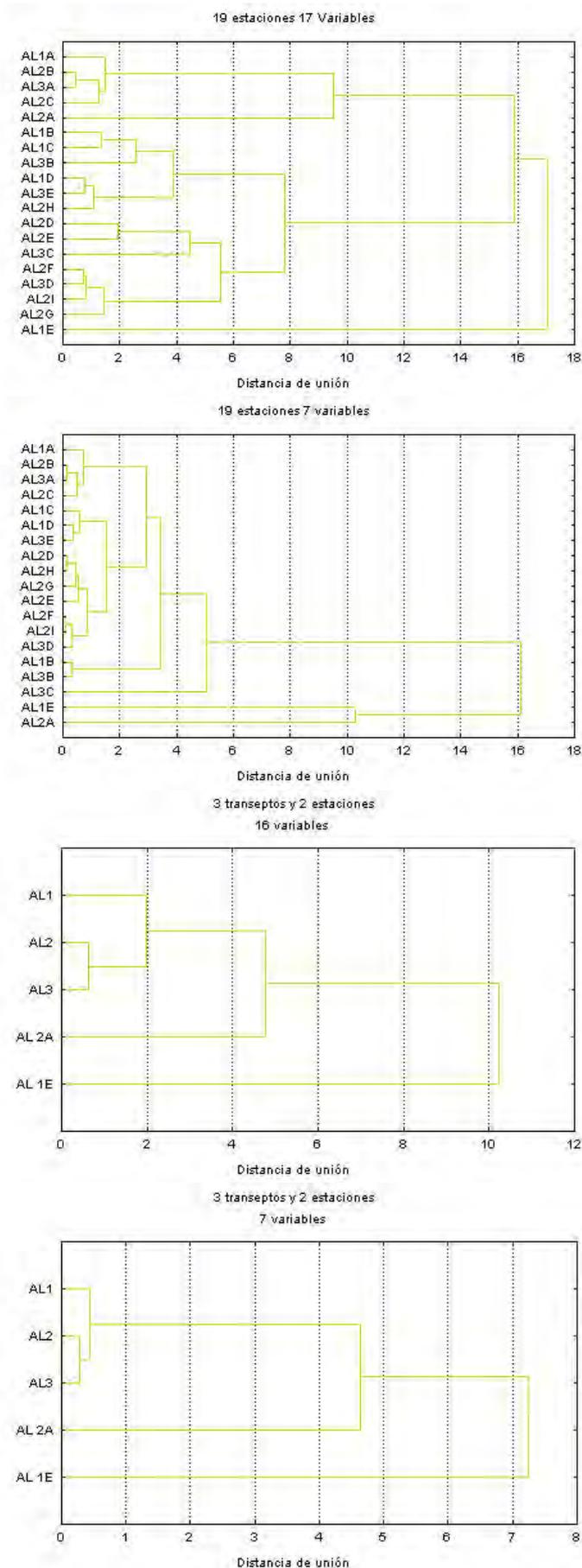


Figura C II.14. Dendrogramas obtenidos del análisis cluster en la Bahía de Algeciras (cont.)

En las tres áreas ambientales descritas en los apartados anteriores, ha sido posible corroborar algunos de los resultados obtenidos mediante otras técnicas de análisis de datos (p.e. matrices de correlación de Pearson). En el caso de la Bahía de Algeciras hemos visto en el apartado anterior que el limitado número de casos hace que muchas de las asociaciones entre parámetros no se hayan obtenido de forma significativa por lo que algunas de las asociaciones de variables que se detallan a continuación no pueden corroborarse con otras técnicas de análisis de datos.

De los dendogramas de variables se obtienen las siguientes asociaciones:

Dendograma de 16 variables.

Las primeras asociaciones más significativas que se producen son las siguientes:

- Clorofila *a*, *b* y *c*.
- Amonio, fosfato y fósforo.
- Sólidos en suspensión y volátiles.
- Otras asociaciones que se producen con más distancia son el grupo entre nitritos, silicatos, carbono orgánico y nitratos.

Dendograma de 7 variables.

Las asociaciones que se producen son las siguientes:

- Nitratos, nitritos y sílice.
- Amonio y fosfatos, y secuencialmente con carbono total y fósforo.

Hay que significar que aunque se producen agrupamientos entre variables, las distancias de unión en general, son mucho mas grandes que las obtenidos en Cádiz y Huelva.

Dendograma de estaciones y transectos

En los dendogramas de estaciones y en los de transectos, las agrupaciones se realizan por similitud en la composición del agua.

Al igual que ocurría con los dendogramas de Huelva y Cádiz, existe un gran número de estaciones consideradas en el análisis por tanto, la zonificación puede ser difícil de interpretar.

En el diagrama construido considerando 16 variables físico-químicas se observan dos zonas muy significativas mas una tercera donde se pueden incluir las estaciones no clasificadas en las primeras. La **primera zona** interesante es la formada por las estaciones próximas a la **desembocadura de los ríos Palmones y Guadarranque** (AI 1A y AI 3A) incluyendo las **estaciones próximas al polígono industrial de Los Barrios**. Este grupo su una posteriormente con la estación AI 2A que como ya se ha comentado en varias ocasiones, coincide con el punto de mezcla de uno de los vertidos industriales más importantes de la bahía.

El **segundo grupo** lo forma una única estación la cual al suprimir en todos los análisis de datos los resultados de AI 2A, ha sido la estación que ha presentado una mayor contaminación en la bahía. Esta es la **estación AI 1E situada en la zona de influencia de la salida de una de las bocanas del puerto de Algeciras**.

La **tercera zona** está formada por un gran conjunto de estaciones de la bahía la cual podría considerarse como las **estaciones de aguas de mejor calidad**.

En el dendograma de estaciones realizado exclusivamente con variables relativas a nutrientes vemos como se mantienen las tres zonas descritas en el apartado anterior y sólo aparece una diferencia muy significativa que es la agrupación de la estación AI 2A con la AI 1E.

Para la realización de los diagramas de transectos y debido a las grandes diferencias encontradas entre las estaciones AI 1E y AI 2 A, se han excluido estas estaciones en el computo de promedios del transecto y se han incluido como dos estaciones individuales para realizar el cluster.

Tal y como muestran los diagramas, se obtienen los mismos resultados de agrupamientos en el cluster realizado con 16 variables que el realizado con 7 variables. En ambos se obtiene un grupo formado por los tres transectos generales (AI1, AI2 y AI3) y de forma aislada las dos estaciones individuales.

Muchas de los resultados obtenidos en este apartado se corroboran con los comentarios realizados en los diagramas de box-whisker, en los cuales no se ha encontrado una zonificación marcada en la Bahía de Algeciras, pero si hay que **diferenciar claramente las estaciones próximas a fuentes de contaminación (desembocadura de ríos y puerto de Algeciras) y próximas a costa, de las estaciones centrales.**

4.4.4.3. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES EN LA BAHÍA DE ALGECIRAS

Para el análisis de componentes principales, se ha suprimido la estación AI 2A con objeto de que no distorsione los resultados globales de la Bahía de Algeciras.

Al igual que para el análisis cluster, para la realización del PCA/FA se ha operado con las variables transformadas logarítmicamente y estandarizadas. Tras un análisis previo de componentes principales se ha realizado una rotación varimax de los factores iniciales.

Puesto que no se ha realizado el análisis de metales en la Bahía de Algeciras, el PCA/FA de esta área ambiental se ha centrado en el análisis de nutrientes.

Las siguientes tablas muestran el número de autovalores/autovectores obtenidos en este análisis, así como la varianza explicada por cada uno de los factores, y la varianza total explicada. El número total de autovalores/autovectores utilizados en el PCA/FA se ha seleccionado siguiendo el criterio de algunos autores los cuales consideran todos aquellos autovalores/autovectores de valor mayor a 1.

Así pues, para 10 variables vemos como se obtienen 3 autovalores los cuales explican el 81.3% de la varianza total.

Tabla C II.66. Análisis factorial para 10 variables

| | <i>Autovalores</i> | <i>% Varianza total</i> | <i>Autovalores acumulados</i> | <i>% Varianza acumulado</i> |
|---|--------------------|-------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 1 | 4.368 | 43.682 | 4.368 | 43.682 |
| 2 | 2.747 | 27.470 | 7.115 | 71.152 |
| 3 | 1.012 | 10.116 | 8.127 | 81.268 |

Tabla C II.67. Factores obtenidos para 10 variables

| | <i>Factor 1</i> | <i>Factor 2</i> | <i>Factor 3</i> |
|---------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
| <i>Amonio</i> | <u>0.909</u> | 0.065 | 0.277 |
| <i>Nitritos</i> | -0.082 | 0.334 | <u>0.728</u> |
| <i>Nitratos</i> | -0.174 | <u>0.975</u> | 0.108 |
| <i>Nitrógeno disuelto</i> | 0.224 | <u>0.938</u> | 0.244 |
| <i>Fosfatos</i> | <u>0.926</u> | 0.043 | 0.230 |
| <i>Fósforo total</i> | <u>0.780</u> | -0.096 | 0.045 |
| <i>Sílice</i> | 0.306 | 0.154 | <u>0.821</u> |
| <i>Carbono total</i> | <u>0.871</u> | 0.089 | 0.169 |
| <i>Carbono inorgánico</i> | <u>0.758</u> | -0.134 | -0.389 |
| <i>Carbono orgánico</i> | 0.332 | 0.302 | <u>0.725</u> |
| Expl.Var | 3.916 | 2.099 | 2.111 |
| Prp.Totl | 0.392 | 0.210 | 0.211 |

El primer factor está formado por las variables amonio, fosfatos, fósforo total, carbono total y carbono inorgánico. Notar que estos parámetros presentan muy bajos contenidos en la Bahía de Algeciras sobre todo los referentes a fósforo. Sin embargo, son lo que explican un mayor porcentaje de la varianza de los resultados con un total de un 43,7%. Este grupo de parámetros aparece formando un grupo en el análisis cluster. Las diferentes concentraciones de estos parámetros en las diferentes estaciones de la bahía, y los análisis estadísticos realizados previamente a este análisis factorial permiten apuntar la posibilidad de que este primer factor realmente representa la estación AI 1E la cual ha presentado concentraciones de estos parámetros, excepcionalmente anómalos a los obtenidos en el resto de las estaciones. Por tanto, y en función de los resultados y el número y localización de estaciones de muestreo de este estudio, **se identifica a esta estación AI 1E** (o el área litoral localizada en las proximidades de esta estación) **como uno de los focos principales de contaminación de la Bahía de Algeciras.**

El segundo factor está formado por los parámetros nitratos y nitrógeno disuelto (este último está formado en un muy alto porcentaje por el contenido de nitratos en las aguas). Este segundo factor explica el 27,5% de la varianza de los resultados. Este **segundo factor** indica la **contaminación puntual por nitratos en la Bahía de Algeciras.**

Finalmente, el tercer factor está formado por el resto de parámetros incluidos en este análisis: nitritos, sílice y carbono orgánico.

4.5. ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS ZONAS AMBIENTALES DE ESTUDIO

Este último análisis que se realiza de los resultados físico-químicos tiene por objeto analizar comparativamente la calidad de las aguas de las cuatro áreas ambientales de estudio. Para ello, se han utilizado varias de las herramientas de análisis empleadas en el análisis individualizado de cada zona de estudio tales como análisis estadístico, diagramas de datos ordenados, diagramas de box-whisker y análisis cluster de casos.

Para la construcción de los diagramas de datos ordenados y puesto que en cada área ambiental de estudio tenemos diferente número de observaciones, y con objeto de normalizar el eje-x para todas las áreas, se ha calculado el porcentaje de aportación de cada observación sobre el total. Por ejemplo, en Cádiz se han obtenido 67 observaciones del parámetro *amonio*. Estas observaciones se corresponden con el 100% de las realizadas en la Bahía de Cádiz para este parámetro. La observación N°=10 de los datos ordenados representaría el 14,9% del total de las observaciones ($\%_i = (N_i \cdot 100) / N_{\text{Total}}$; $\%_{N^{\circ}=10} = (10 \cdot 100) / 67 = 14,9$). En el río Iro para el mismo parámetro y habiendo realizado en total 17 observaciones, la observación N°=10 de los datos ordenados representaría el 58,8% del total de las observaciones.

Las consideraciones previas elegidas para la elaboración de los diagramas de datos ordenados y de box-whisker, y para el análisis cluster de casos son las mismas señaladas en los apartados correspondientes a cada área ambiental.

4.5.1. DIAGRAMAS DE DATOS ORDENADOS. DIAGRAMAS DE BOX-WHISKER.

Se han construido los diagramas de datos ordenados y diagramas de box-whiskers de los parámetros más analizados y de mayor relevancia en las cuatro áreas. Estos son: *amonio*, *nitritos*, *nitratos*, *nitrógeno*, *fosfatos*, *fósforo*, *silice*, *sólidos en suspensión* y *carbono orgánico*.

Con objeto de diferenciar las nubes de puntos de cada área ambiental, se ha identificado cada una de ellas con un color y un marcador diferente.

| | | | | |
|---|---------------------|--------------|-----------------------|--|
|  | Ría de Huelva | ... Azul | ... Triángulo |  |
|  | Bahía de Cádiz | ... Verde | ... Círculo |  |
|  | Río Iro | ... Rojo | ... Cuadrado |  |
|  | Bahía de Algeciras | ... Amarillo | ... Rombo |  |
|  | Límite de detección | ... Rosa | ... Recta discontinua |  |

Se han establecido dos *ejes-Y* debido a que los niveles en el río Iro son muy elevados y por tanto enmascaran la variación relativa de las otras tres áreas ambientales. Así, el *eje-Y secundario* (derecha) representa la escala correspondiente al Río Iro. En aquellos parámetros en los que los niveles coinciden, esta escala es igual que la del *eje-Y principal*.

Al lado del diagrama de datos ordenados se ha incluido una tabla que sustituye al histograma incluido en los apartados de áreas ambientales. Esta tabla muestra para cada área, el porcentaje de muestras que presenta valores inferiores o iguales a los mostrados en la fila correspondiente. Esta concentración se ha determinado por interpolación lineal de los dos porcentajes (superior e inferior) que comprenden el que nos interesa. Por ejemplo, en el río Iro si quisiéramos calcular la concentración que corresponde al 50% de las muestras buscaríamos el caso superior y el inferior (47 y 53%) y sus concentraciones (0,998 y 1,296 mg/L NH₄⁺). Realizando la interpolación se obtendría el valor de 1,147 mg/L para el 50% de las muestras (en este caso, debería coincidir con la mediana calculada en el Río Iro (Tabla C II.52.). La figura ilustra este proceso.

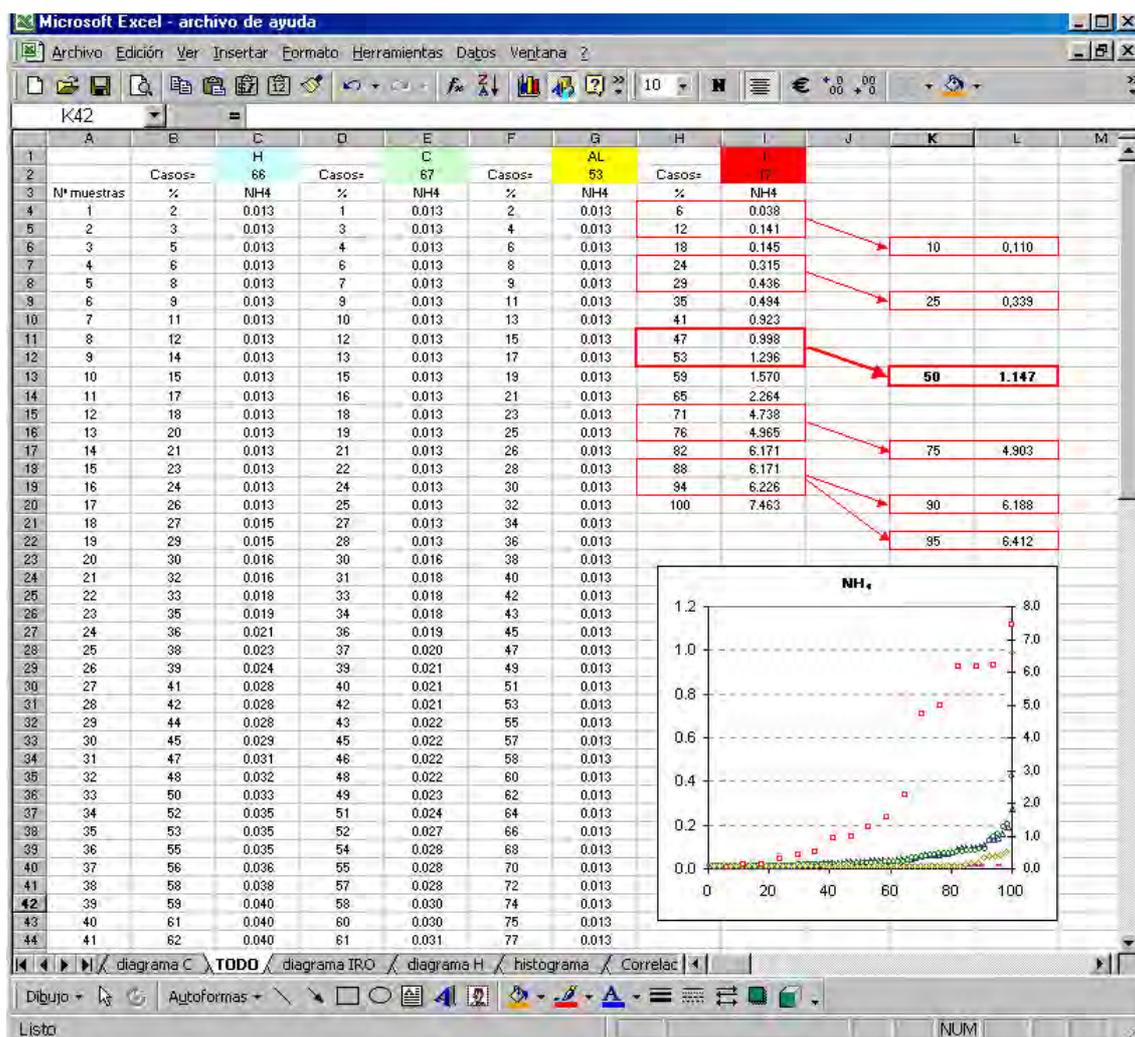


Figura C II.15. Ejemplo que ilustra el proceso para el cálculo de concentraciones de los parámetros que cumplen un porcentaje % de las observaciones

Para aquellas variables que tengan definidos objetivos de calidad en la legislación andaluza, las tablas incluyen dos filas inferiores correspondientes a los criterios para *aguas limitadas* y *aguas normales* (BOJA, 1997). El cálculo en este caso sería contrario, es decir, buscaríamos las dos concentraciones que comprendieran estos valores y calcularíamos el porcentaje. Este porcentaje representa que para esta concentración "legal" un "n %" de muestras cumple con este criterio, es decir, la concentración medida en ese porcentaje de muestras es inferior al valor legal. Aquellas áreas ambientales que todos los valores medidos de una parámetro cumplan con el criterio legal, presentarán en estas celdas un 100%.

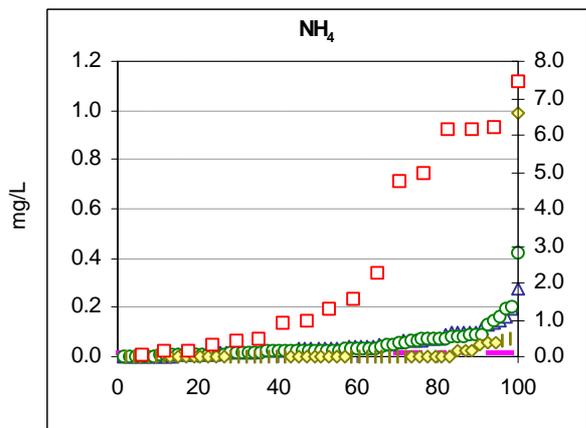
Por último, con objeto de resaltar cuándo estos porcentajes de "incumplimiento" son críticos, se ha coloreado las celdas siguiendo un criterio de colores basado en el establecido en el Directiva 60/2000/CE, Marco de Aguas (DOCE, 2000). El criterio que seleccionamos es el siguiente:

| % | Código de colores | Clasificación de la calidad del agua | Definición/Observaciones |
|--------|-------------------|--------------------------------------|--|
| 100 | | <u>Calidad muy buena</u> | Todas las observaciones cumplen con los objetivos de calidad |
| 100-95 | | Buena | Sólo un 5 % de las observaciones incumple los criterios de calidad |
| 95-90 | | Aceptable | Un 10 % de las observaciones no superan los criterios de calidad |
| 90-75 | | Deficiente | Entre un 10 y un 90% de las muestras no cumple con los niveles legales |
| 75-50 | | | |
| 50-25 | | | |
| 25-10 | | | |
| 10-5 | | Mala | El 95 % de las muestras incumple los niveles legales |
| 0 | | Muy mala | Del 95 al 100 % de las muestras incumple con los criterios legales |

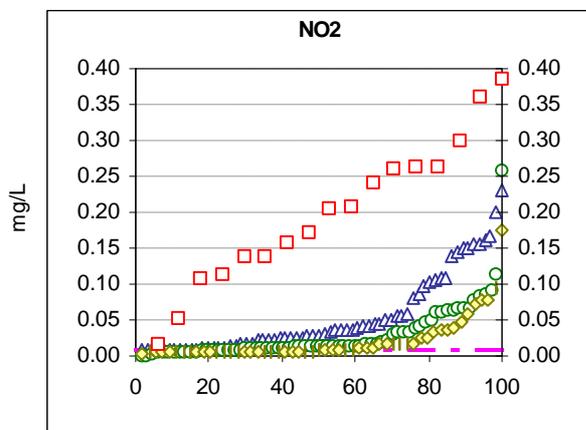
(Notar que el criterio de colores de la Directiva está referido al estado de calidad ecológica. Para el estado de calidad química, el código es para el estado química bueno *-azul-* y para aquellas aguas que no alcanzan el buen estado *-rojo-*. El criterio propuesto permite una clasificación más detallada).

No es objeto de este capítulo, realizar el análisis de los objetivos de calidad legislados en aguas andaluzas. Este análisis se incluirá en el *Capítulo IV*.

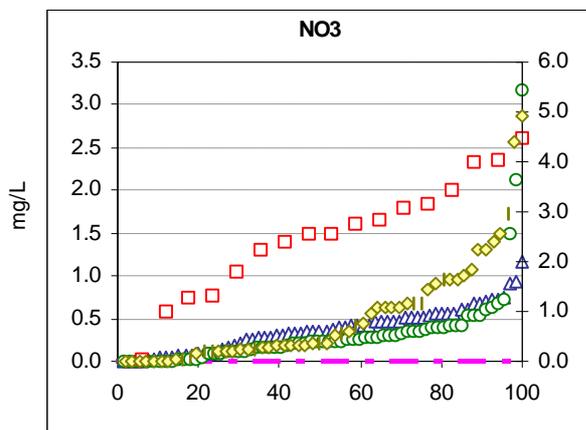
Diagramas de datos ordenados



Número de casos acumulado



Número de casos acumulado



Número de casos acumulado

△ H: Ría de Huelva ○ C: Bahía de Cádiz □ I: Río Iro ◆ AI: Bahía de Algeciras

Tablas de porcentajes de muestras

| NH ₄ ⁺ (mg/L) | | | | |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Porcentajes | H | C | I | AI |
| 5 | 0,013 | 0,013 | 0,032 | 0,013 |
| 10 | 0,013 | 0,013 | 0,110 | 0,013 |
| 25 | 0,013 | 0,013 | 0,339 | 0,013 |
| 50 | 0,033 | 0,024 | 1,147 | 0,013 |
| 75 | 0,065 | 0,064 | 4,908 | 0,013 |
| 90 | 0,104 | 0,088 | 6,188 | 0,042 |
| 95 | 0,143 | 0,155 | 6,412 | 0,062 |
| 100 | 0,274 | 0,421 | 7,463 | 0,993 |
| AL: 1,200 mg/L | 100% | 100% | 51,0% | 100% |
| AN: 1,000 mg/L | 100% | 100% | 47,1% | 100% |

| NO ₂ ⁻ (mg/L) | | | | |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Porcentajes | H | C | I | AI |
| 5 | 0,007 | 0,007 | 0,015 | 0,007 |
| 10 | 0,007 | 0,007 | 0,042 | 0,007 |
| 25 | 0,013 | 0,009 | 0,121 | 0,008 |
| 50 | 0,029 | 0,014 | 0,189 | 0,013 |
| 75 | 0,070 | 0,034 | 0,263 | 0,018 |
| 90 | 0,150 | 0,067 | 0,318 | 0,054 |
| 95 | 0,161 | 0,086 | 0,365 | 0,079 |
| 100 | 0,229 | 0,260 | 0,387 | 0,174 |
| AL: 1,000 mg/L | 100% | 100% | 100% | 100% |
| AN: 0,600 mg/L | 100% | 100% | 100% | 100% |

| NO ₃ ⁻ (mg/L) | | | | |
|-------------------------------------|--------|--------|--------|--------|
| Porcentajes | H | C | I | AI |
| 5 | 0,009 | 0,009 | 0,017 | 0,009 |
| 10 | 0,031 | 0,009 | 0,414 | 0,009 |
| 25 | 0,121 | 0,093 | 0,848 | 0,208 |
| 50 | 0,353 | 0,224 | 1,494 | 0,353 |
| 75 | 0,514 | 0,357 | 1,837 | 1,168 |
| 90 | 0,694 | 0,535 | 2,248 | 2,347 |
| 95 | 0,747 | 0,710 | 2,361 | 2,547 |
| 100 | 1,161 | 3,169 | 2,616 | 4,902 |
| AL: 1,400 mg/L | 100% | 96,8 % | 41,7 % | 73,8 % |
| AN: 1,000 mg/L | 99,0 % | 96,1 % | 28,2 % | 63,1 % |

Figura C II.16.
Diagramas de datos ordenados. Concentraciones de los parámetros que no superan p% de las observaciones realizadas. Diagramas box-whisker
ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CUATRO ÁREAS LITORALES

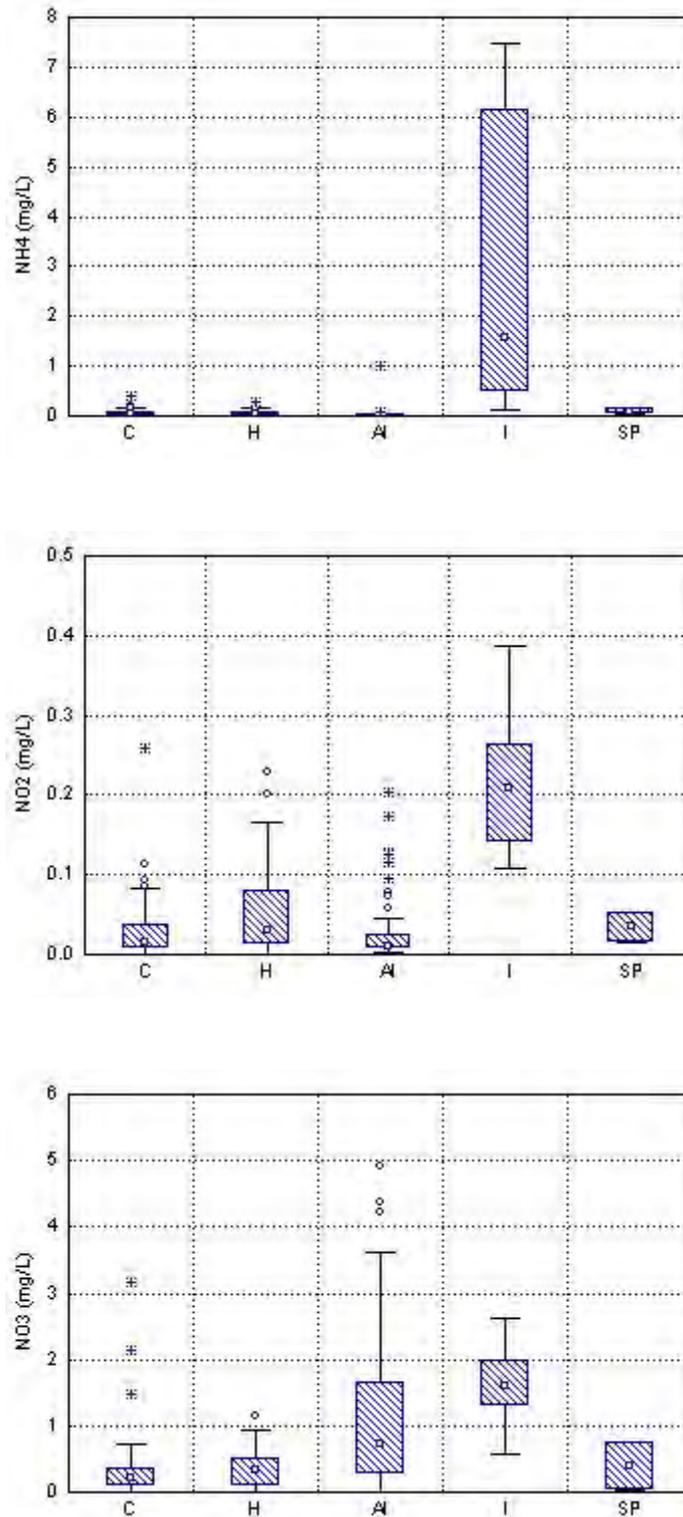
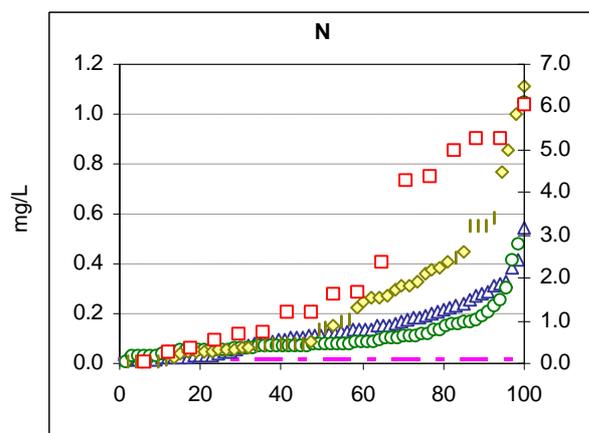


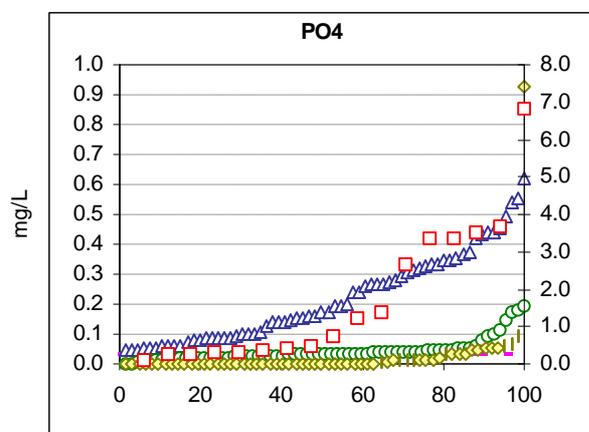
Figura C II.16.
Diagramas de datos ordenados. Concentraciones de los parámetros que no superan p% de las observaciones realizadas. Diagramas box-whisker
ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CUATRO ÁREAS LITORALES

Diagramas de datos ordenados

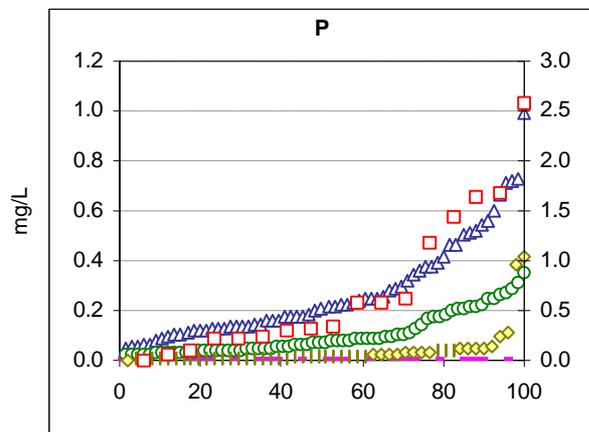
Tablas de porcentajes de muestras



Número de casos acumulado



Número de casos acumulado



Número de casos acumulado

△ H: Ría de Huelva ○ C: Bahía de Cádiz □ I: Río Iro ◆ Al: Bahía de Algeciras

| N (mg/L) | | | | |
|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| Porcentajes | H | C | I | Al |
| 5 | 0,014 | 0,031 | 0,035 | 0,014 |
| 10 | 0,019 | 0,041 | 0,220 | 0,014 |
| 25 | 0,041 | 0,059 | 0,611 | 0,052 |
| 50 | 0,114 | 0,078 | 1,443 | 0,138 |
| 75 | 0,188 | 0,116 | 4,347 | 0,357 |
| 90 | 0,283 | 0,195 | 2,248 | 0,554 |
| 95 | 0,329 | 0,290 | 5,403 | 0,800 |
| 100 | 0,545 | 1,047 | 6,061 | 1,113 |
| (*) AL: 1,553 mg/L | 100% | 100% | 50,9% | 100% |
| (*) AN: 1,187 mg/L | 100% | 100% | 42,3% | 100% |

(*) Valores resultante de la suma de los criterios de NH₄⁺, NO₂⁻ y NO₃⁻ expresados como N

| PO ₄ ³⁻ (mg/L) | | | | |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|
| Porcentajes | H | C | I | Al |
| 5 | 0,048 | 0,031 | 0,078 | 0,031 |
| 10 | 0,057 | 0,031 | 0,195 | 0,031 |
| 25 | 0,085 | 0,031 | 0,316 | 0,031 |
| 50 | 0,172 | 0,034 | 0,619 | 0,031 |
| 75 | 0,324 | 0,042 | 3,175 | 0,031 |
| 90 | 0,433 | 0,080 | 3,578 | 0,055 |
| 95 | 0,495 | 0,136 | 4,173 | 0,058 |
| 100 | 0,622 | 0,192 | 6,844 | 0,926 |
| (*) AL: 2,453 mg/L | 100% | 100% | 67,9% | 100% |
| (*) AN: 1,840 mg/L | 100% | 100% | 55,6% | 100% |

(*) Criterio del P expresado como PO₄³⁻

| P (mg/L) | | | | |
|----------------|-------|-------|-------|-------|
| Porcentajes | H | C | I | Al |
| 5 | 0,057 | 0,027 | 0,010 | 0,010 |
| 10 | 0,082 | 0,029 | 0,050 | 0,010 |
| 25 | 0,130 | 0,041 | 0,216 | 0,010 |
| 50 | 0,209 | 0,072 | 0,329 | 0,015 |
| 75 | 0,367 | 0,148 | 1,035 | 0,034 |
| 90 | 0,552 | 0,222 | 1,650 | 0,052 |
| 95 | 0,714 | 0,268 | 1,813 | 0,103 |
| 100 | 0,989 | 0,353 | 2,570 | 0,415 |
| AL: 0,800 mg/L | 98,9% | 100% | 72,5% | 100% |
| AN: 0,600 mg/L | 92,0% | 100% | 67,1% | 100% |

Figura C II.16.
Diagramas de datos ordenados. Concentraciones de los parámetros que no superan p% de las observaciones realizadas. Diagramas box-whisker
ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CUATRO ÁREAS LITORALES

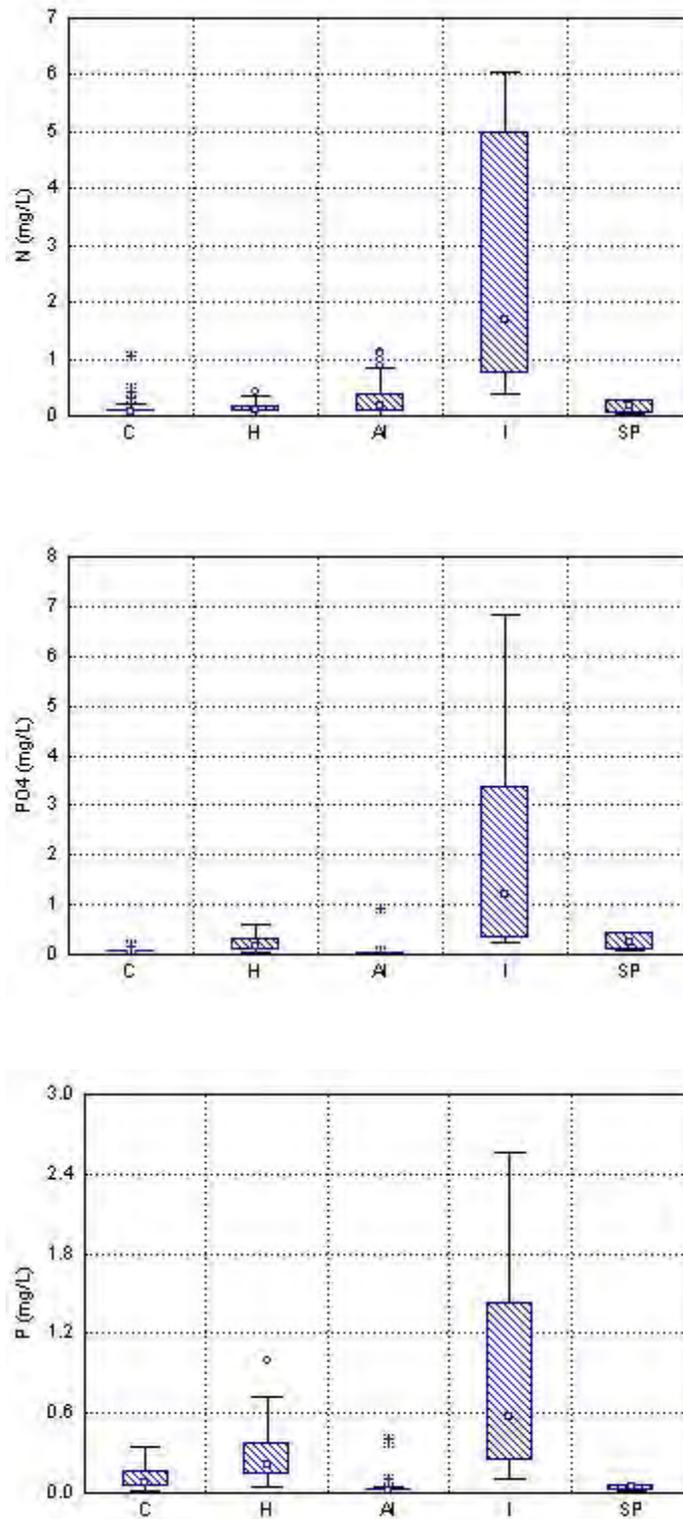
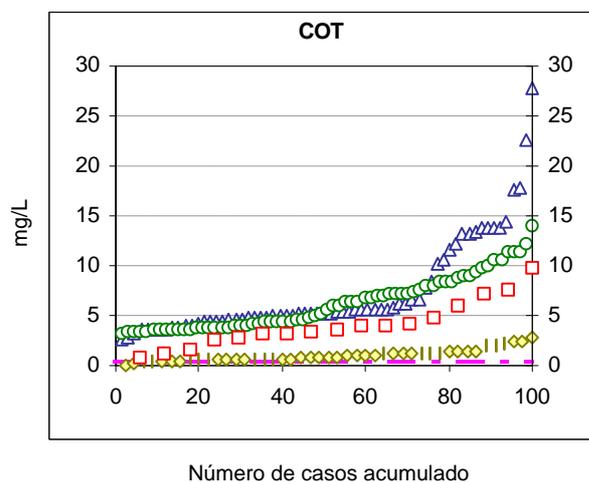
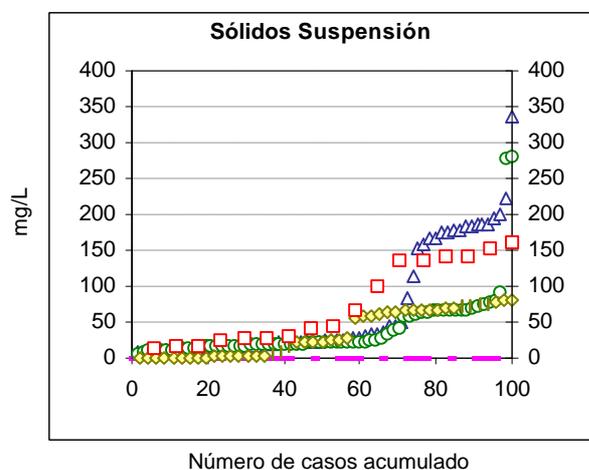
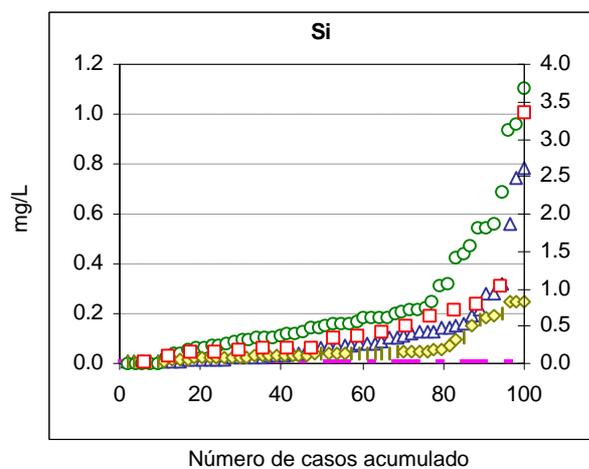


Figura C II.16.
Diagramas de datos ordenados. Concentraciones de los parámetros que no superan p% de las observaciones realizadas. Diagramas box-whisker
ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CUATRO ÁREAS LITORALES

Diagramas de datos ordenados



△ H: Ría de Huelva ○ C: Bahía de Cádiz □ I: Río Iro ◆ AI: Bahía de Algeciras

Tablas de porcentajes de muestras

| Porcentajes | Si (mg/L) | | | |
|------------------|-----------|-------|-------|-------|
| | H | C | I | AI |
| 5 | 0,011 | 0,011 | 0,031 | 0,011 |
| 10 | 0,011 | 0,016 | 0,090 | 0,011 |
| 25 | 0,020 | 0,071 | 0,168 | 0,025 |
| 50 | 0,068 | 0,150 | 0,329 | 0,038 |
| 75 | 0,126 | 0,225 | 0,612 | 0,049 |
| 90 | 0,254 | 0,544 | 0,879 | 0,179 |
| 95 | 0,391 | 0,778 | 1,393 | 0,222 |
| 100 | 0,784 | 1,106 | 3,365 | 0,251 |
| AL= No criterios | --- | --- | --- | --- |
| AN= No criterios | --- | --- | --- | --- |

| Porcentajes | Sólidos Suspensión (mg/L) | | | |
|----------------|---------------------------|-------|-------|------|
| | H | C | I | AI |
| 5 | 7,9 | 10,0 | 11,2 | 1,0 |
| 10 | 10,9 | 12,2 | 15,8 | 1,0 |
| 25 | 13,0 | 17,9 | 26,3 | 2,3 |
| 50 | 23,6 | 21,0 | 42,3 | 23,0 |
| 75 | 154,0 | 62,0 | 135,4 | 66,5 |
| 90 | 184,5 | 70,0 | 144,2 | 73,9 |
| 95 | 194,2 | 79,3 | 153,2 | 77,4 |
| 100 | 336,4 | 280,0 | 162,5 | 81,0 |
| AL= 1,3- MN=52 | 70,8 | 71,2 | 55,0 | 58,5 |
| AN= 1,2- MN=48 | 70,0 | 70,8 | 54,0 | 58,2 |

MN –Media Normal- Sancti Petri (estación de referencia)=40 mg/L (Ver Tabla C II.53.)

| Porcentajes | COT (mg/L) | | | |
|-------------|------------|-------|------|-------|
| | H | C | I | AI |
| 5 | 3,17 | 3,46 | 0,81 | 0,50 |
| 10 | 3,64 | 3,55 | 1,06 | 0,50 |
| 25 | 4,43 | 3,89 | 2,67 | 0,56 |
| 50 | 5,26 | 5,37 | 3,53 | 0,83 |
| 75 | 8,12 | 7,99 | 4,65 | 1,24 |
| 90 | 13,83 | 10,08 | 7,39 | 2,00 |
| 95 | 17,62 | 11,39 | 7,98 | 2,37 |
| 100 | 27,83 | 13,95 | 9,71 | 2,89 |
| AL= 5 | 38,9 | 48,3 | 77,6 | 100,0 |
| AN= 3 | 3,8 | 0,0 | 33,1 | 100,0 |

Figura C II.16.
Diagramas de datos ordenados. Concentraciones de los parámetros que no superan p% de las observaciones realizadas. Diagramas box-whisker
ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CUATRO ÁREAS LITORALES

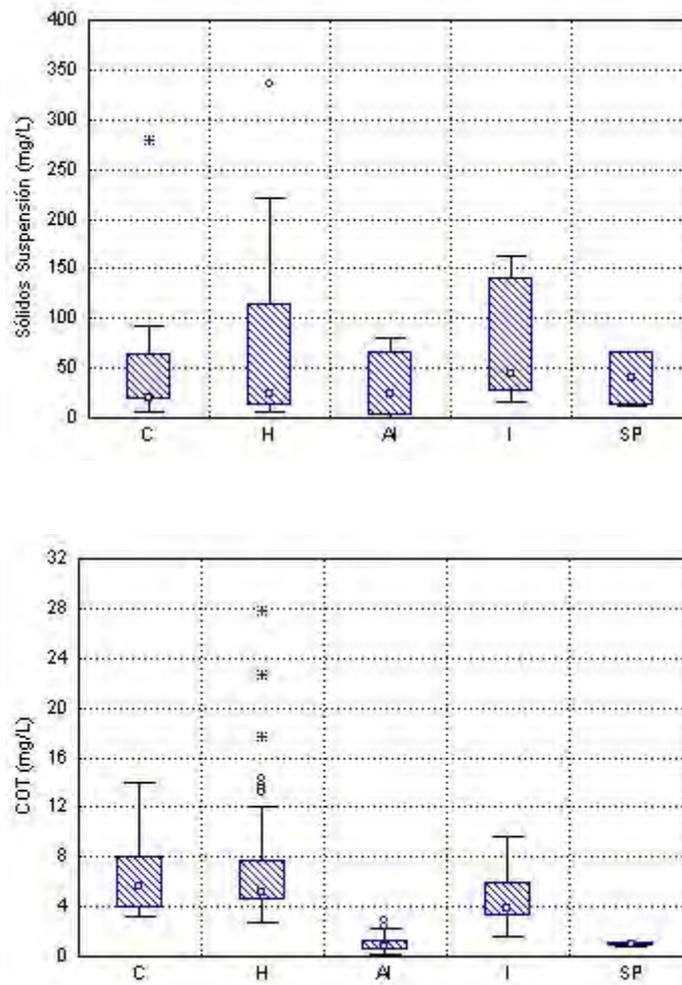


Figura C II.16.
Diagramas de datos ordenados. Concentraciones de los parámetros que no superan p% de las observaciones realizadas. Diagramas box-whisker
ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS CUATRO ÁREAS LITORALES

AMONIO

Existe una **gran diferencia entre los valores de amonio obtenidos en el Río Iro y las tres áreas ambientales restantes**, como así se puede apreciar en los diagramas de datos ordenados y de box-whiskers. Al estar afectado directamente por el vertido de las aguas residuales de la estación depuradora de "El Torno" pueden considerarse "normales" las altas concentraciones de amonios medidas en estaciones próximas al punto de vertido. Las estaciones que presentan valores más parecidos al resto de áreas son las localizadas en el tramo final I-8 e I-7 y las observaciones realizadas en la estación de Sancti Petri.

Con respecto al resto de áreas ambientales, se observa que existe bastante similitud entre la nube de valores de Huelva y Cádiz, e inferior en Algeciras. Las diferencias relativas entre estas tres curvas se ven enmascarada por la presencia de un gran número de valores anómalos y extremos (3 anómalos localizados en C1D, C5A y C5E, y un extremo en Cádiz en C5F; 2 anómalos localizado en H5F y H2A, y 1 extremo localizado en H5E en Huelva; más de 15 valores extremos en Algeciras). En el caso de que se suprimiesen estos valores extremos se observaría la misma similitud entre la variación de niveles de amonio en Cádiz y Huelva, y valores inferiores en Algeciras.

En relación con la forma de la distribución de amonio en cada área ambiental se observa cómo el valor de la mediana para las cuatro áreas ambientales está muy por debajo de la mitad de la caja, esto es, los valores promedios en las cuatro áreas ambientales están muy influenciados por las estaciones que presentan mayores concentraciones (fundamentalmente estaciones interiores).

NITRITOS

En el caso de los nitritos, los niveles encontrados en las cuatro áreas litorales permiten construir un diagrama con un único *eje-y*. Claramente se observa que los **valores correspondientes al río Iro son superiores al resto de estaciones**. En relación al resto de las zonas ambientales, Cádiz y Algeciras siguen una distribución de datos muy parecida con gran número de observaciones no detectadas, mientras que en Huelva los niveles son ligeramente superiores.

En el diagrama de box-whisker, se detectan un gran número de valores anómalos y extremos en Cádiz (3 valores anómalos en C3A, C5F y C5E, y un valor extremo en C4B), Huelva (dos valores anómalos en H5E y H5E) y Algeciras (3 valores anómalos y seis extremos localizados en diferentes estaciones todas ellas muy próximas a la desembocadura de los ríos Palmones y Guadarranque).

En Cádiz, Huelva y Algeciras se observa como el valor de la mediana está desplazada hacia la zona baja de la caja lo que indica una tendencia mayoritaria a valores bajos. Todos los valores anómalos y extremos están situados en la zona superior correspondiéndose con los valores obtenidos en las estaciones más interiores en Cádiz y Huelva, y en Algeciras como ya se ha detallado en el párrafo anterior.

La estación de Sancti Petri presenta una caja de cierta amplitud (no gran amplitud pero considerable para una estación de referencia).

NITRATOS

Con respecto a nitratos ha habido que incluir un *eje-y secundario* debido a las altas concentraciones obtenidas el río Iro.

Un gran porcentaje de observaciones realizadas en la **Bahía de Algeciras presentan valores de nitratos superiores a los obtenidos en Cádiz y Huelva**. Estos valores están localizados en la desembocadura de los ríos Palmones y Guadarranque y en las estaciones próximas al puerto de Algeciras. En Cádiz y Huelva, sólo las estaciones localizadas en aguas interiores presentan valores similares a los obtenidos en Algeciras.

En Cádiz se identifican tres valores extremos (dos en H5A y uno en H5E), un valor anómalo en la Ría de Huelva (H4B), y tres valores anómalos en Algeciras (dos en AI 3A y uno en AI 1A).

En relación a la forma de la distribución se observa en todas las áreas ambientales, que el punto que representa la mediana está centrado en la caja y en general los whiskers presentan la misma proporción. Así, la distribución de estos valores en cada área ambiental se aproximan a una distribución normal de los valores de nitratos.

NITRÓGENO

Mediante este parámetro se resume el contenido de nitrógeno disuelto en las cuatro áreas litorales de estudio. Realizando el cálculo de los porcentajes de aportación de cada una de las especies de nitrógeno sobre el contenido total se obtiene los siguiente:

| Datos | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras | Golfo de Cádiz |
|--------------------------------------|---------------|----------------|---------|--------------------|----------------|
| Promedio de N-NH ₄ (mg/L) | 0.037 | 0.037 | 2.290 | 0.024 | 0.174 |
| Promedio de N-NO ₂ (mg/L) | 0.017 | 0.009 | 0.067 | 0.008 | 0.014 |
| Promedio de N-NO ₃ (mg/L) | 0.080 | 0.073 | 0.366 | 0.253 | 0.157 |
| ΣPromedio N (mg/L) | 0.134 | 0.119 | 2.723 | 0.285 | 0.345 |
| % N-NH ₄ | 27.6 | 31.1 | 84.1 | 8.4 | 50.4 |
| % N-NO ₂ | 12.7 | 7.6 | 2.5 | 2.8 | 4.1 |
| % N-NO ₃ | 59.7 | 61.3 | 13.4 | 88.8 | 45.5 |
| % ΣN | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 | 100.0 |

De forma comparada el área litoral que presenta un mayor contenido de nitrógeno disuelto es el río Iro, seguido de la Bahía de Algeciras, Ría de Huelva y por último la Bahía de Cádiz. Los porcentajes de aportación de cada especie es distinta en cada zona. En el río Iro la especie dominante es el amonio puesto que está muy afectado por un vertido reciente de aguas residuales urbanas, la Bahía de Algeciras presenta un porcentaje muy elevado de nitratos y bajo de los otros dos. La Ría de Huelva y la Bahía de Cádiz presenta un comportamiento muy parecido.

En el diagrama de datos ordenados podemos observar la variación relativa del nitrógeno disuelto en cada zona ambiental. Para el río Iro se ha tenido que considerar un *eje-y secundario* para mostrar los altos niveles de nitrógeno en esta área ambiental.

En el diagrama de box-whisker se observa bien la distribución de valores en cada zona ambiental. Observar también los niveles de nitratos en la estación de referencia de Sancti Petri. Se observa como presenta niveles superiores a los medidos en Huelva y Cádiz posiblemente por la influencia que recibe del agua de salida del sistema de marismas de Sancti-Petri.

Se detectan varios valores anómalos y extremos en las tres áreas de menor concentración de nitrógeno. En Cádiz se detectan dos valores anómalos (C5A C2A) y cuatro valores extremos (C5A, C2C, C5E y C1B); en Huelva un único valor anómalo (H5F); y en Algeciras se detectan cuatro concentraciones anómalas (dos localizados en AI 3A, y en AI 1B y AI 2B).

FOSFATOS

En relación con los fosfatos se ha tenido que incluir un *eje-y secundario* debido al alto contenido obtenido en todas las observaciones realizadas en el Río Iro. En relación al resto de las áreas ambientales se observa que Huelva presente niveles bastante superiores a fosfatos respecto a Cádiz y Algeciras, y finalmente entre estas dos, si bien se observan muy bajas concentraciones, en Cádiz suelen ser

superiores pudiéndose obtener niveles de fosfatos en casi todas las observaciones realizadas. En **Algeciras**, los niveles de fosfatos son tan pequeños, que gran parte de las observaciones se encuentran **por debajo del límite de detección del método analítico**.

En Cádiz se obtienen 3 valores anómalos (2 de C5A y 1 de C5E) y 5 extremos (4 de C5F y 1 de C5E) y en Algeciras 7 valores extremos y 2 anómalos. Todos los valores extremos y anómalos de Algeciras se corresponden con las observaciones detectadas.

FÓSFORO TOTAL

Al igual que con fosfatos y nitratos, se ha construido un *eje-y secundario* para los valores del río Iro. La distribución de valores de las otras tres zonas ambientales coinciden con la de fosfatos, sin embargo, para este parámetro, los valores determinados en Cádiz son mucho más altos que los de Algeciras.

En el diagrama de box-whisker se identifican 5 valores extremos en Algeciras y 1 en Huelva. En este caso, en Algeciras en más del 50% de las muestras se han detectado niveles de fósforo y por tanto las observaciones que aparecen como valores extremos se deben a valores inusuales o excesivamente altos sobre la media. Estas observaciones coinciden con aquellas estaciones más próximas a tierra cerca de núcleos urbanos o industriales (AI 3E, AI 1D, AI 3C, AI 1E) o en zonas donde el tráfico marítimo es muy intenso (AI 2E). En Huelva, el valor anómalo se corresponde con el punto H2A (muelle industrial).

En relación con la forma de la distribución se observan whiskers inferiores cortos y la mediana desplazada hacia la parte inferior de la caja, por tanto, la distribución de valores es más densa en bajas concentraciones que en altas correspondientes a estaciones interiores.

SILICATOS

Se ha construido un *eje-y secundario* para los valores del río Iro. Para las otras tres áreas ambientales se observa que la gran mayoría de observaciones de Huelva y Algeciras presentan valores muy similares excepto en las estaciones interiores de Huelva. Para este parámetro se observa como los niveles de sílice en aguas de la Bahía de Cádiz son superiores a los de Huelva y Algeciras.

Para este parámetro, existe un gran número de valores anómalos o extremos. Tenemos 3 valores anómalos en Cádiz (C5B, C3B, C3C: estrecho de puntales o zona límite entre el saco externo e interno de la Bahía) y 4 extremos (C5F, C5E, C4B, y C4A: estaciones interiores y saco interno de la Bahía), 3 valores extremos en Huelva (H5E, H5F, y H1C), uno en el Río Iro (I3), y 7 valores anómalos en Algeciras y 6 extremos.

SÓLIDOS EN SUSPENSIÓN

En relación con los sólidos en suspensión se han mantenido los dos ejes en la misma escala.

En relación con los sólidos en suspensión se comprueba que las observaciones en Huelva, Cádiz y río Iro presentan dos grupos de valores. Un grupo de valores de bajas concentraciones y un grupo de altas concentraciones en sólidos. En el caso de la Bahía de Algeciras, se aprecian estos dos grupos pero de forma muy atenuada. El hecho de que se repita este cambio en las cuatro áreas ambientales hace pensar que pueda ser por un sesgo que se comete en los resultados debido al método analítico.

El diagrama de box-whisker muestra la homogeneidad de resultados entre las cuatro áreas ambientales. Sólo se identifican un par de valores fuera del rango de valores válidos (dos valores extremos en la estación C5F de el mismo valor; y un valor anómalo en H5F).

COT

Para este parámetro los *ejes-y* construidos presentan la misma escala de valores, sin embargo observando la tabla de valores se observa que los niveles en cada una de las zonas es muy distinto de las otras. La zona que presenta mayores niveles de carbono orgánico es Ría de Huelva seguida de Bahía de Cádiz, Estuario del Río Iro y Bahía de Algeciras.

En este sentido y a la vista del resto de parámetros, de los niveles de contaminación obtenidos en el río Iro, de la calidad de las aguas en el Bahía de Cádiz, y el hecho de que estos estudios se han realizado divididos en el tiempo en dos bloques (Cádiz-Huelva; Iro-Algeciras) se podría pensar que ha habido un sesgo en los resultados analíticos puesto que es bastante improbable que las aguas del río Iro presenten menor contenido de carbono total que la Bahía de Cádiz e incluso que en aguas interiores de la Ría de Huelva.

No obstante, se ha mantenido este parámetro en el análisis de las áreas ambientales, puesto que en caso de que existiera un sesgo de los valores entre áreas ambientales, en un mismo área ambiental los niveles entre estaciones de muestreo guardarían una proporción relativa que es evaluable además de la variación relativa de otros parámetros (mediante la estandarización de las variables se trabaja con la varianza del conjunto de estaciones y no con cantidades absolutas de concentración de los parámetros).

4.5.2. ANÁLISIS CLUSTER DE LAS ESTACIONES DE MUESTREO

Mediante este análisis se pretende obtener similitudes entre las diferentes áreas de estudio con objeto de realizar una clasificación de las aguas limitadas de estudio.

Puesto que en el análisis individualizado de las áreas ambientales se concluyó que para realizar una zonificación más clara y visual es mejor trabajar con transectos de muestreo o con estaciones individualizadas de características especiales (estaciones interiores o de especial contaminación), para el análisis cluster global se ha de trabajar con aquellos transectos y estaciones individualizadas consideradas anteriormente. Este análisis cluster se ha realizado estandarizando las variables una vez considerado todo el conjunto de estaciones y transectos incluidos en el análisis.

El siguiente dendograma muestra los resultados obtenidos.

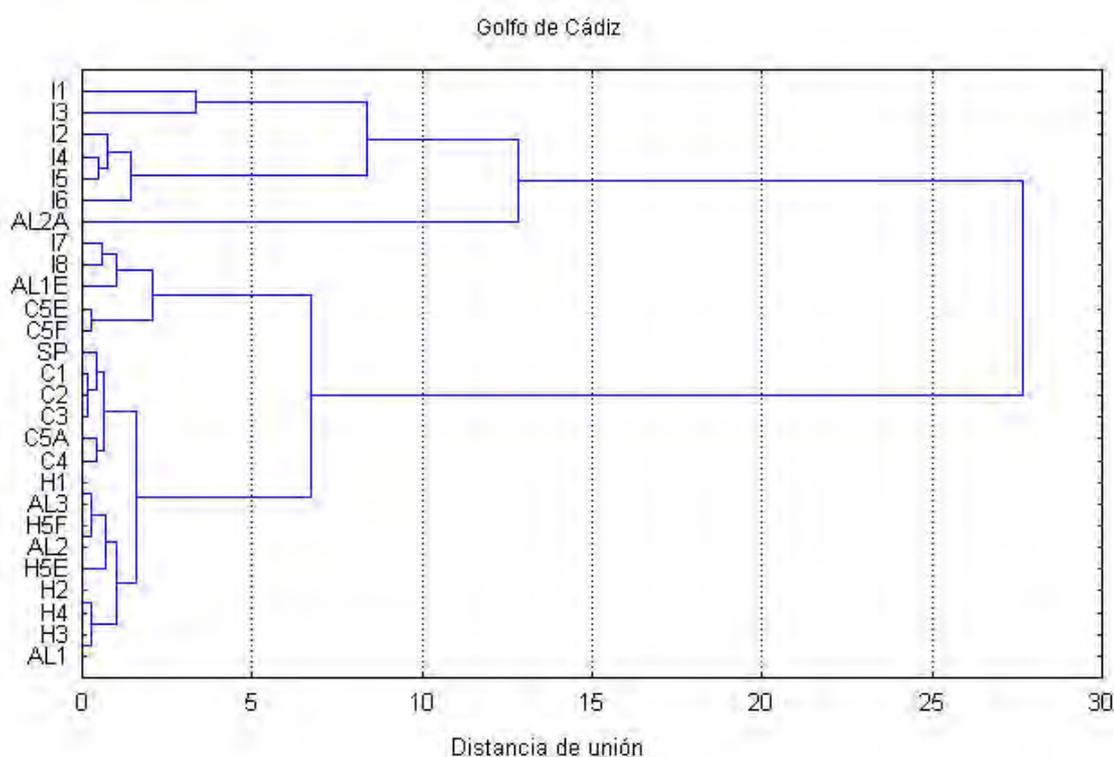


Figura C II.17. Dendrograma obtenidos del análisis cluster de casos para el conjunto de transectos y estaciones interiores del Golfo de Cádiz

Los resultados muestran grupos interesantes de estaciones y conclusiones:

- Grupo 1. Se observa una alta concentración de estaciones en un mismo grupo para todas las áreas ambientales lo que ya indica que **cada zona ambiental presenta aguas de calidad diferente.**
- Grupo 2. El primer grupo localizado en la zona superior del gráfico está formado por las estaciones más interiores del río Iro. Estas estaciones se unen para formar un nuevo grupo el cual se une por similitud a la estación AL 2A.
- Grupo 3. Existe otra agrupación de estaciones de calidad de aguas similar formadas por las dos estaciones más exteriores del río Iro (I7 y I8), las cuales se unen a la estación localizada en las inmediaciones del Puerto de Algeciras y por último, se unen a un pequeño grupo de dos estaciones interiores de la Bahía de Cádiz (C5E y C5F).
- Otro grupo de estaciones que presentan aguas de parecida composición son las correspondientes a los transectos de la Bahía de Cádiz junto con Sancti Petri y C5A. Este grupo está formado en su base por un pequeño grupo formado por los tres transectos exteriores de la Bahía de Cádiz, grupo que se une posteriormente a la estación de Sancti Petri. Por último se unen a un pequeño grupo de dos estaciones de peor calidad (C4 y C5A).
- Grupo 4. El último grupo de estaciones que se identifica es el formado por un conjunto de estaciones y transectos de Huelva y Algeciras. Las interacciones a pequeña escala son difíciles de observar en el dendrograma, así pues sólo se indicarán las estaciones que forman parte de este grupo. Se observan todos los transectos y estaciones interiores de Huelva y los tres transectos de Algeciras.

En relación con las distancias de unión hay que señalar las cortas distancias de unión resultantes en los grupos 3 y 4, distancias intermedias en el grupo 2 y grandes distancias en el grupo 1. Estas diferencias se muestran como posteriores agrupamientos de estos primeros cuatro grupos (grupo 3-4, grupo 3-4-2, grupo 3-4-2-1).

Finalmente, con objeto de diferenciar visualmente los grupos se incluye un dendograma con indicaciones acerca de los diferentes grupos comentados

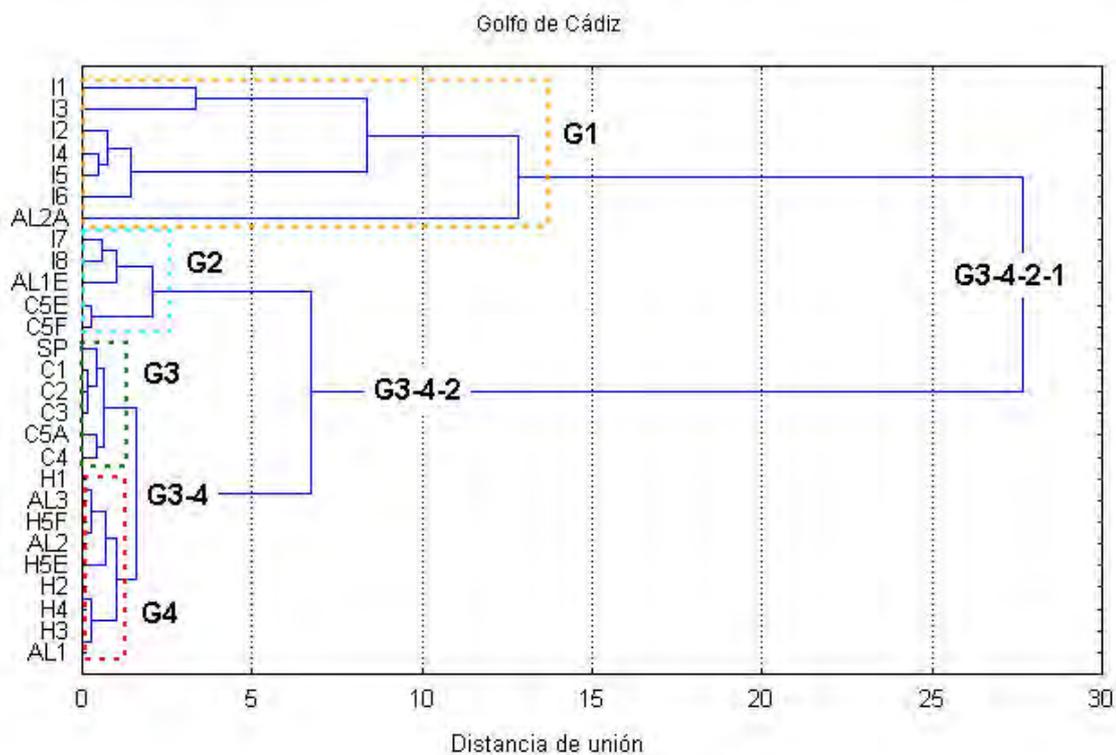


Figura C II.17.b. Dendograma obtenidos del análisis cluster de casos para el conjunto de transectos y estaciones interiores del Golfo de Cádiz. Agrupaciones principales

4.6. ÍNDICES DE CALIDAD AMBIENTAL

En este apartado se muestran los índices de calidad obtenidos en cada una de las áreas litorales de estudio.

4.6.1. ÍNDICES DE CALIDAD EN LA RÍA DE HUELVA

Las siguientes tablas muestran los índices de calidad ambiental obtenidos en aguas de la Ría de Huelva.

Tabla C II.68. I_c de la Ría de Huelva. Estaciones de muestreo

| Máx. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _c ¾ |
|--------------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------------------|
| | N-NH4 | N-NO2 | N-NO3 | P-PO4 | P | Si | Cl a | CT | SS | |
| | 0,119 | 0,033 | 0,129 | 0,152 | 0,458 | 0,367 | 13,45 | 39,43 | 101,83 | |
| ¾Ratio To Maximum¾ | | | | | | | | | | ¾I _c ¾ |
| H1A | 0,403 | 0,879 | 0,589 | 0,809 | 0,729 | 0,444 | 0,833 | 0,808 | 0,632 | |
| H1B | 0,454 | 0,848 | 0,659 | 0,763 | 0,830 | 0,327 | 0,833 | 0,744 | 0,575 | 0,654 |
| H1C | 0,437 | 0,909 | 0,845 | 0,789 | 0,858 | 0,638 | 0,833 | 0,721 | 1,000 | 0,771 |
| H2A | 0,622 | 0,606 | 0,527 | 0,691 | 0,967 | 0,134 | 0,515 | 0,763 | 0,579 | 0,589 |
| H2B | 0,336 | 0,667 | 0,643 | 0,618 | 0,472 | 0,125 | 0,515 | 0,797 | 0,661 | 0,545 |
| H2C | 0,336 | 0,727 | 0,550 | 0,599 | 0,520 | 0,213 | 0,515 | 0,882 | 0,574 | 0,512 |
| H3A | 0,176 | 0,212 | 0,326 | 0,250 | 0,352 | 0,123 | 0,312 | 0,808 | 0,583 | 0,334 |
| H3B | 0,109 | 0,273 | 0,504 | 0,283 | 0,434 | 0,139 | 0,312 | 0,759 | 0,518 | 0,328 |
| H3C | 0,160 | 0,333 | 0,310 | 0,309 | 0,522 | 0,101 | 0,312 | 0,775 | 0,614 | 0,360 |
| H4A | 0,109 | 0,152 | 0,535 | 0,145 | 0,576 | 0,272 | 0,210 | 0,845 | 0,643 | 0,320 |
| H4B | 0,118 | 0,091 | 0,798 | 0,145 | 0,559 | 0,150 | 0,210 | 0,790 | 0,694 | 0,333 |
| H4C | 0,126 | 0,152 | 0,690 | 0,171 | 0,638 | 0,163 | 0,210 | 0,791 | 0,550 | 0,333 |
| H5A | 0,437 | 0,485 | 0,837 | 0,421 | 0,347 | 0,300 | 0,210 | 0,775 | 0,810 | 0,500 |
| H5B | 0,160 | 0,364 | 0,628 | 0,375 | 0,404 | 0,136 | 0,238 | 1,000 | 0,677 | 0,442 |
| H5C | 0,227 | 0,152 | 0,659 | 0,178 | 0,258 | 0,125 | 0,401 | 0,844 | 0,822 | 0,365 |
| H5D | 0,109 | 0,121 | 0,721 | 0,099 | 0,282 | 0,153 | 0,674 | 0,810 | 0,704 | 0,322 |
| H5E | 1,000 | 1,000 | 0,977 | 0,809 | 0,880 | 1,000 | 1,000 | 0,660 | 0,646 | 0,908 |
| H5F | 0,529 | 0,758 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,918 | 0,918 | 0,724 | 0,712 | 0,820 |

Tabla C II.69. I_{Ref.} de la Ría de Huelva. Estaciones de muestreo

| Ref. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _{Ref.} ¾ |
|----------------------|------------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|----------------------|
| | N-NH4 | N-NO2 | N-NO3 | P-PO4 | P | Si | Cl a | CT | SS | |
| | 0,005 | 0,010 | 0,050 | 0,010 | 0,075 | 0,050 | 1,000 | 28,00 | 75,00 | |
| ¾Ratio To Reference¾ | | | | | | | | | | ¾I _{Ref.} ¾ |
| H1A | 9,600 | 2,900 | 1,520 | 12,300 | 4,453 | 3,260 | 11,200 | 1,137 | 0,859 | |
| H1B | 10,800 | 2,800 | 1,700 | 11,600 | 5,067 | 2,400 | 11,200 | 1,048 | 0,781 | 5,266 |
| H1C | 10,400 | 3,000 | 2,180 | 12,000 | 5,240 | 4,680 | 11,200 | 1,015 | 1,358 | 5,675 |
| H2A | 14,800 | 2,000 | 1,360 | 10,500 | 5,907 | 0,980 | 6,925 | 1,075 | 0,785 | 4,926 |
| H2B | 8,000 | 2,200 | 1,660 | 9,400 | 2,880 | 0,920 | 6,925 | 1,122 | 0,898 | 3,778 |
| H2C | 8,000 | 2,400 | 1,420 | 9,100 | 3,173 | 1,560 | 6,925 | 1,242 | 0,780 | 3,844 |
| H3A | 4,200 | 0,700 | 0,840 | 3,800 | 2,147 | 0,900 | 4,200 | 1,138 | 0,792 | 2,080 |
| H3B | 2,600 | 0,900 | 1,300 | 4,300 | 2,653 | 1,020 | 4,200 | 1,068 | 0,703 | 2,083 |
| H3C | 3,800 | 1,100 | 0,800 | 4,700 | 3,187 | 0,740 | 4,200 | 1,091 | 0,834 | 2,272 |
| H4A | 2,600 | 0,500 | 1,380 | 2,200 | 3,520 | 2,000 | 2,825 | 1,190 | 0,873 | 1,899 |
| H4B | 2,800 | 0,300 | 2,060 | 2,200 | 3,413 | 1,100 | 2,825 | 1,112 | 0,942 | 1,861 |
| H4C | 3,000 | 0,500 | 1,780 | 2,600 | 3,893 | 1,200 | 2,825 | 1,114 | 0,746 | 1,962 |
| H5A | 10,400 | 1,600 | 2,160 | 6,400 | 2,120 | 2,200 | 2,825 | 1,091 | 1,100 | 3,322 |
| H5B | 3,800 | 1,200 | 1,620 | 5,700 | 2,467 | 1,000 | 3,200 | 1,408 | 0,919 | 2,368 |
| H5C | 5,400 | 0,500 | 1,700 | 2,700 | 1,573 | 0,920 | 5,400 | 1,188 | 1,116 | 2,277 |
| H5D | 2,600 | 0,400 | 1,860 | 1,500 | 1,720 | 1,120 | 9,063 | 1,141 | 0,955 | 2,262 |
| H5E | 23,800 | 3,300 | 2,520 | 12,300 | 5,373 | 7,340 | 13,450 | 0,929 | 0,877 | 7,765 |
| H5F | 12,600 | 2,500 | 2,580 | 15,200 | 6,107 | 6,740 | 12,350 | 1,019 | 0,966 | 6,674 |

Tabla C II.70. I_c de la Ría de Huelva. Transectos

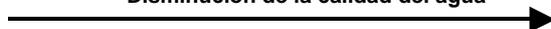
| Máx. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _c ¾ |
|--------------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------------------|
| | N-NH4 | N-NO2 | N-NO3 | P-PO4 | P | Si | Cl a | CT | SS | |
| | 0,119 | 0,033 | 0,129 | 0,152 | 0,458 | 0,367 | 13,450 | 32,09 | 74,94 | |
| ¾Ratio To Maximum¾ | | | | | | | | | | ¾I _c ¾ |
| H1 | 0,429 | 0,879 | 0,698 | 0,789 | 0,806 | 0,469 | 0,833 | 0,931 | 1,000 | 0,759 |
| H2 | 0,429 | 0,667 | 0,574 | 0,638 | 0,653 | 0,158 | 0,515 | 1,000 | 0,815 | 0,605 |
| H3 | 0,151 | 0,273 | 0,380 | 0,283 | 0,437 | 0,120 | 0,312 | 0,959 | 0,777 | 0,410 |
| H4 | 0,118 | 0,121 | 0,674 | 0,151 | 0,592 | 0,196 | 0,210 | 0,994 | 0,854 | 0,434 |
| H5E | 1,000 | 1,000 | 0,977 | 0,809 | 0,880 | 1,000 | 1,000 | 0,811 | 0,878 | 0,928 |
| H5F | 0,529 | 0,758 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,918 | 0,918 | 0,889 | 0,967 | 0,887 |

Tabla C II.71. I_{Ref} de la Ría de Huelva. Transectos

| Ref. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _{Ref} ¾ |
|--------------------|------------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|---------------------|
| | N-NH4 | N-NO2 | N-NO3 | P-PO4 | P | Si | Cl a | CT | SS | |
| | 0,005 | 0,010 | 0,050 | 0,010 | 0,075 | 0,050 | 1,000 | 28,00 | 75,00 | |
| ¾Ratio To Maximum¾ | | | | | | | | | | ¾I _{Ref} ¾ |
| H1 | 10,200 | 2,900 | 1,800 | 12,000 | 4,920 | 3,440 | 11,200 | 1,066 | 0,999 | 5,392 |
| H2 | 10,200 | 2,200 | 1,480 | 9,700 | 3,987 | 1,160 | 6,925 | 1,146 | 0,814 | 4,179 |
| H3 | 3,600 | 0,900 | 0,980 | 4,300 | 2,667 | 0,880 | 4,200 | 1,099 | 0,776 | 2,156 |
| H4 | 2,800 | 0,400 | 1,740 | 2,300 | 3,613 | 1,440 | 2,825 | 1,139 | 0,853 | 1,901 |
| H5E | 23,800 | 3,300 | 2,520 | 12,300 | 5,373 | 7,340 | 13,450 | 0,929 | 0,877 | 7,765 |
| H5F | 12,600 | 2,500 | 2,580 | 15,200 | 6,107 | 6,740 | 12,350 | 1,019 | 0,966 | 6,674 |

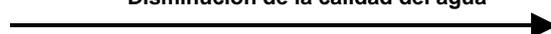
Una vez obtenidos los índices de calidad y de contaminación, se han ordenado las estaciones de muestreo con el objeto de visualizar mejor la variación en la calidad del agua en la ría.

Disminución de la calidad del agua



| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| I_c | H4A | H5D | H3B | H4B | H4C | H3A | H3C | H5C | H5B | H5A | H2C | H2B | H2A | H1B | H1A | H1C | H5F | H5E |
| | 0,320 | 0,322 | 0,328 | 0,333 | 0,333 | 0,334 | 0,360 | 0,365 | 0,442 | 0,500 | 0,512 | 0,545 | 0,589 | 0,654 | 0,675 | 0,771 | 0,820 | 0,908 |

Disminución de la calidad del agua



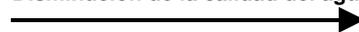
| | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| I_{Ref} | H4B | H4A | H4C | H3A | H3B | H5D | H3C | H5C | H5B | H5A | H2B | H2C | H2A | H1A | H1B | H1C | H5F | H5E |
| | 1,861 | 1,899 | 1,962 | 2,080 | 2,083 | 2,262 | 2,272 | 2,277 | 2,368 | 3,322 | 3,778 | 3,844 | 4,926 | 5,248 | 5,266 | 5,675 | 6,674 | 7,765 |

Disminución de la calidad del agua

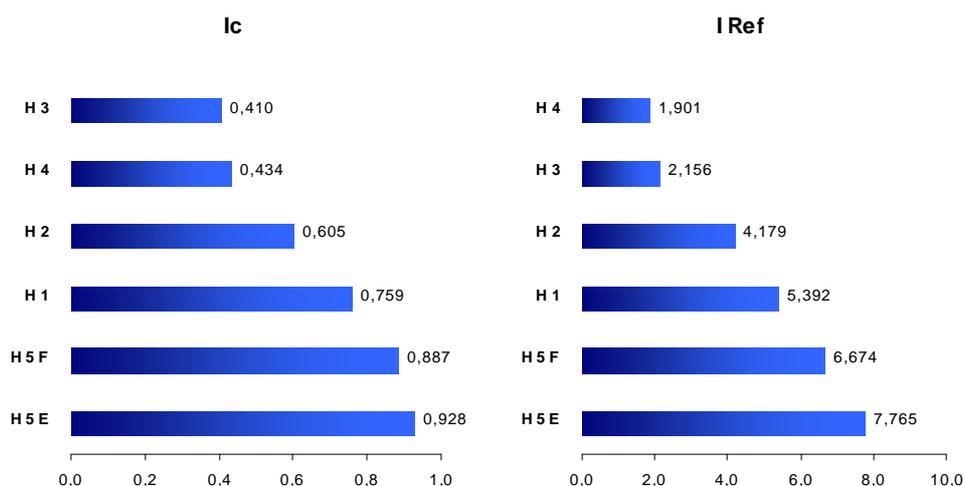


| | | | | | | |
|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| I_c | H3 | H4 | H2 | H1 | H5F | H5E |
| | 0,410 | 0,434 | 0,605 | 0,759 | 0,887 | 0,928 |

Disminución de la calidad del agua



| | | | | | | |
|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| I_{Ref} | H4 | H3 | H2 | H1 | H5F | H5E |
| | 1,901 | 2,156 | 4,179 | 5,392 | 6,674 | 7,765 |



Representación gráfica de los índices de calidad obtenidos en la Ría de Huelva

Índice de contaminación en la Ría de Huelva

Los índices de contaminación de las estaciones situadas en la Ría de Huelva presentan un amplio rango de variación ($I_{c_{H4A}} = 0,320 - I_{c_{H5E}} = 0,908$) indicativo de que existe una variación espacial en la calidad de las aguas. En los diagramas en los cuales se han ordenado estos índices se observa como esta variabilidad está asociada a la morfología de la ría. Así, las estaciones que presentan valores más altos del índice, son las dos estaciones correspondientes a los ríos Tinto (H5E) y Odiel (H5F). Ambas estaciones presentan un porcentaje muy elevado de parámetros que presentan el máximo valor. H5E presenta las concentraciones más altas de *amonio*, *nitritos silicatos* y *clorofila a*, y la estación H5F presenta los máximos de *nitratos*, *fosfatos* y *fósforo*. A continuación aparecen las tres estaciones correspondientes al transecto H1, y posteriormente las estaciones correspondientes a H2, H3 y H4 siguiendo la morfología de la ría. Entre estos se localizan los resultados I_c obtenidos para las estaciones correspondientes al transecto longitudinal.

El agua en el punto H5A correspondiente a la estación más exterior de la ría aparece con valores de calidad similares a los obtenidos en el transecto H2. Hay que notar que en el análisis de resultados físico-químicos, se identificó en varias ocasiones una anomalía en los resultados obtenidos en estaciones de H4. Para H5A se comentó la posibilidad de que posiblemente la calidad de las aguas en este área está afectada por agentes externos a la propia ría (en algunos casos se atribuyó a posibles vertidos procedentes de Mazagón por la presencia de *coliformes* y *estreptococos fecales* en las aguas). Por tanto, no puede considerarse que H4 y H5A representen el grado de dilución de la contaminación de la ría en su desembocadura. H3 es más representativo y da una visión más exacta de los procesos de dilución ocurridos en ésta. Un transecto más exterior a H3 debería situarse aguas arriba de H4.

Esta conclusión se observa claramente en los índices de contaminación calculados para cada transecto global. De nuevo aparecen las estaciones interiores (H5E y H5F) como las más contaminadas, y sucesivamente aparecen H1, H2, H4 y H3.

La selección de una estación de referencia es muy importante no sólo porque represente un punto de "aguas limpias" en el sistema, sino porque muchas normativas basan los objetivos de calidad de algunos parámetros en un porcentaje de aumento o disminución del parámetro respecto a la estación de referencia (BOJA, 1997). Generalmente, se tiende a seleccionar las estaciones situadas en las posiciones más exteriores o más alejadas de los focos de contaminación como *estaciones de referencia*. En el

estudio realizado en la Ría de Huelva no sería posible seguir esta regla general puesto que el efecto de la marea hace que el transecto exterior esté demasiado afectado por otras fuentes de contaminación.

Índice respecto a valores de referencia en la Ría de Huelva

A partir de las conclusiones obtenidas en el apartado anterior, se puede decir que la selección de las estación de referencia en la Ría de Huelva no es fácil y necesitaría un nuevo estudio. Por tanto, es más oportuno fijar unos **valores de referencia** para el cálculo de este índice.

El orden y el significado de los índices calculados es aproximadamente el mismo que el obtenido con el índice de contaminación. Aparecen de nuevo la estación H5E como la estación de aguas de peor calidad, seguidas de la estación H5F, las estaciones de H1, H2, H3 y H4. Las estaciones de H5 se sitúan en posiciones intermedias.

Los resultados obtenidos para este índice muestra un **descenso en la contaminación de las aguas a medida que los transectos se sitúan en posiciones más exteriores**. Por tanto para este índice, el transecto H4 es el que aparece como representativo del agua de mayor calidad del sistema. No obstante, los resultados obtenidos con el I_c indican que no es fácil seleccionar estaciones dentro de la ría como referencia. Para esta área litoral, es más conveniente utilizar los valores de referencia propuestos.

4.6.2. ÍNDICES DE CALIDAD EN LA BAHÍA DE CÁDIZ

Las siguientes tablas muestran los resultados de I_c y el I_{Ref} en las aguas de la Bahía de Cádiz:

Tabla C II.72. I_c de la Bahía de Cádiz. Estaciones de muestreo

| Máx. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _c ¾ |
|----------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------------------|
| | N-NH4 | N-NO2 | N-NO3 | P-PO4 | P | Si | Cl a | CT | SS | |
| | 0,193 | 0,029 | 0,434 | 0,051 | 0,250 | 0,527 | 3,667 | 33,83 | 166,50 | |
| | ¾Ratio To Maximum¾ | | | | | | | | | |
| C1A | 0,114 | 0,138 | 0,129 | 0,098 | 0,444 | 0,194 | 0,252 | 0,898 | 0,189 | 0,273 |
| C1B | 0,057 | 0,138 | 0,157 | 0,098 | 0,216 | 0,207 | 0,252 | 0,927 | 0,180 | 0,248 |
| C1C | 0,062 | 0,172 | 0,104 | 0,098 | 0,232 | 0,237 | 0,252 | 0,891 | 0,177 | 0,247 |
| C1D | 0,187 | 0,276 | 0,150 | 0,255 | 0,196 | 0,211 | 0,252 | 0,951 | 0,176 | 0,295 |
| C2A | 0,207 | 0,138 | 0,129 | 0,216 | 0,252 | 0,334 | 0,273 | 0,913 | 0,184 | 0,294 |
| C2B | 0,124 | 0,207 | 0,106 | 0,098 | 0,316 | 0,226 | 0,273 | 0,946 | 0,177 | 0,275 |
| C2C | 0,104 | 0,138 | 0,373 | 0,098 | 0,148 | 0,216 | 0,273 | 0,872 | 0,166 | 0,265 |
| C3A | 0,140 | 0,379 | 0,090 | 0,196 | 0,404 | 0,395 | 0,336 | 0,910 | 0,175 | 0,336 |
| C3B | 0,104 | 0,241 | 0,088 | 0,098 | 0,300 | 0,510 | 0,336 | 0,894 | 0,175 | 0,305 |
| C3C | 0,135 | 0,241 | 0,101 | 0,098 | 0,396 | 0,478 | 0,336 | 0,927 | 0,234 | 0,327 |
| C4A | 0,124 | 0,276 | 0,074 | 0,275 | 0,644 | 0,554 | 0,536 | 0,971 | 0,187 | 0,404 |
| C4B | 0,140 | 1,000 | 0,062 | 0,275 | 0,660 | 0,723 | 0,536 | 0,929 | 0,178 | 0,500 |
| C5A | 1,000 | 0,483 | 1,000 | 0,569 | 0,768 | 0,343 | 1,000 | 0,913 | 0,324 | 0,711 |
| C5B | 0,026 | 0,103 | 0,097 | 0,098 | 0,160 | 0,425 | 0,259 | 0,924 | 0,229 | 0,258 |
| C5C | 0,155 | 0,138 | 0,175 | 0,098 | 0,196 | 0,398 | 0,300 | 0,967 | 0,184 | 0,290 |
| C5D | 0,057 | 0,103 | 0,131 | 0,196 | 0,368 | 0,448 | 0,436 | 0,992 | 0,216 | 0,328 |
| C5E | 0,472 | 0,552 | 0,417 | 0,725 | 0,800 | 0,825 | 0,809 | 0,983 | 0,234 | 0,646 |
| C5F | 0,580 | 0,793 | 0,138 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,918 | 1,000 | 1,000 | 0,826 |

Tabla C II.73. I_{Ref} de la Bahía de Cádiz. Estaciones de muestreo

| Ref. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _{Ref} ¾ |
|----------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|---------------------|
| | N-NH4 | N-NO2 | N-NO3 | P-PO4 | P | Si | Cl a | CT | SS | |
| | 0,005 | 0,010 | 0,050 | 0,010 | 0,075 | 0,050 | 1,000 | 28,00 | 75,00 | |
| | ¾Ratio To Reference¾ | | | | | | | | | ¾I _{Ref} ¾ |
| C1A | 4,400 | 0,400 | 1,120 | 0,500 | 1,480 | 2,040 | 0,925 | 1,085 | 0,419 | 1,374 |
| C1B | 2,200 | 0,400 | 1,360 | 0,500 | 0,720 | 2,180 | 0,925 | 1,120 | 0,399 | 1,089 |
| C1C | 2,400 | 0,500 | 0,900 | 0,500 | 0,773 | 2,500 | 0,925 | 1,076 | 0,392 | 1,107 |
| C1D | 7,200 | 0,800 | 1,300 | 1,300 | 0,653 | 2,220 | 0,925 | 1,149 | 0,391 | 1,771 |
| C2A | 8,000 | 0,400 | 1,120 | 1,100 | 0,840 | 3,520 | 1,000 | 1,103 | 0,408 | 1,943 |
| C2B | 4,800 | 0,600 | 0,920 | 0,500 | 1,053 | 2,380 | 1,000 | 1,143 | 0,392 | 1,421 |
| C2C | 4,000 | 0,400 | 3,240 | 0,500 | 0,493 | 2,280 | 1,000 | 1,053 | 0,369 | 1,482 |
| C3A | 5,400 | 1,100 | 0,780 | 1,000 | 1,347 | 4,160 | 1,233 | 1,099 | 0,388 | 1,834 |
| C3B | 4,000 | 0,700 | 0,760 | 0,500 | 1,000 | 5,380 | 1,233 | 1,080 | 0,388 | 1,671 |
| C3C | 5,200 | 0,700 | 0,880 | 0,500 | 1,320 | 5,040 | 1,233 | 1,120 | 0,519 | 1,835 |
| C4A | 4,800 | 0,800 | 0,640 | 1,400 | 2,147 | 5,840 | 1,967 | 1,173 | 0,415 | 2,131 |
| C4B | 5,400 | 2,900 | 0,540 | 1,400 | 2,200 | 7,620 | 1,967 | 1,123 | 0,396 | 2,616 |
| C5A | 38,600 | 1,400 | 8,680 | 2,900 | 2,560 | 3,620 | 3,667 | 1,104 | 0,720 | 7,028 |
| C5B | 1,000 | 0,300 | 0,840 | 0,500 | 0,533 | 4,480 | 0,950 | 1,116 | 0,509 | 1,137 |
| C5C | 6,000 | 0,400 | 1,520 | 0,500 | 0,653 | 4,200 | 1,100 | 1,168 | 0,409 | 1,772 |
| C5D | 2,200 | 0,300 | 1,140 | 1,000 | 1,227 | 4,720 | 1,600 | 1,199 | 0,480 | 1,541 |
| C5E | 18,200 | 1,600 | 3,620 | 3,700 | 2,667 | 8,700 | 2,967 | 1,187 | 0,520 | 4,796 |
| C5F | 22,400 | 2,300 | 1,200 | 5,100 | 3,333 | 10,540 | 3,367 | 1,208 | 2,220 | 5,741 |

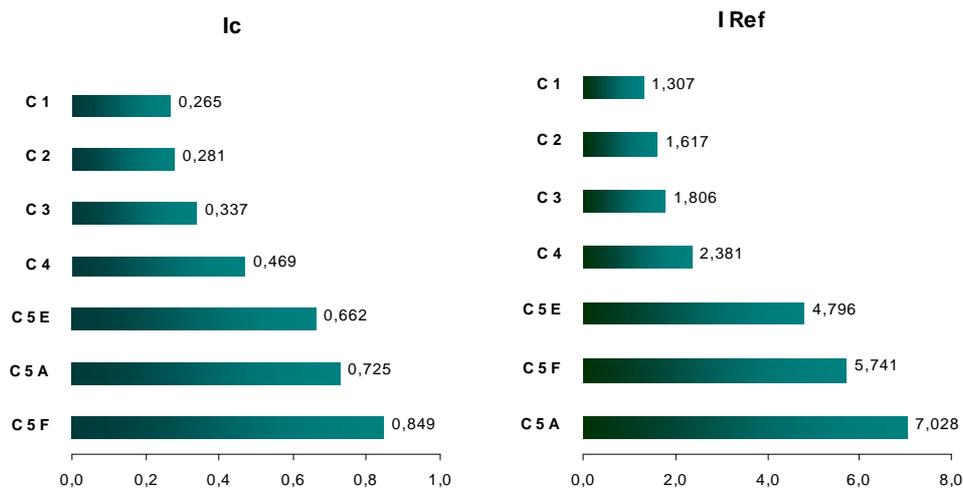
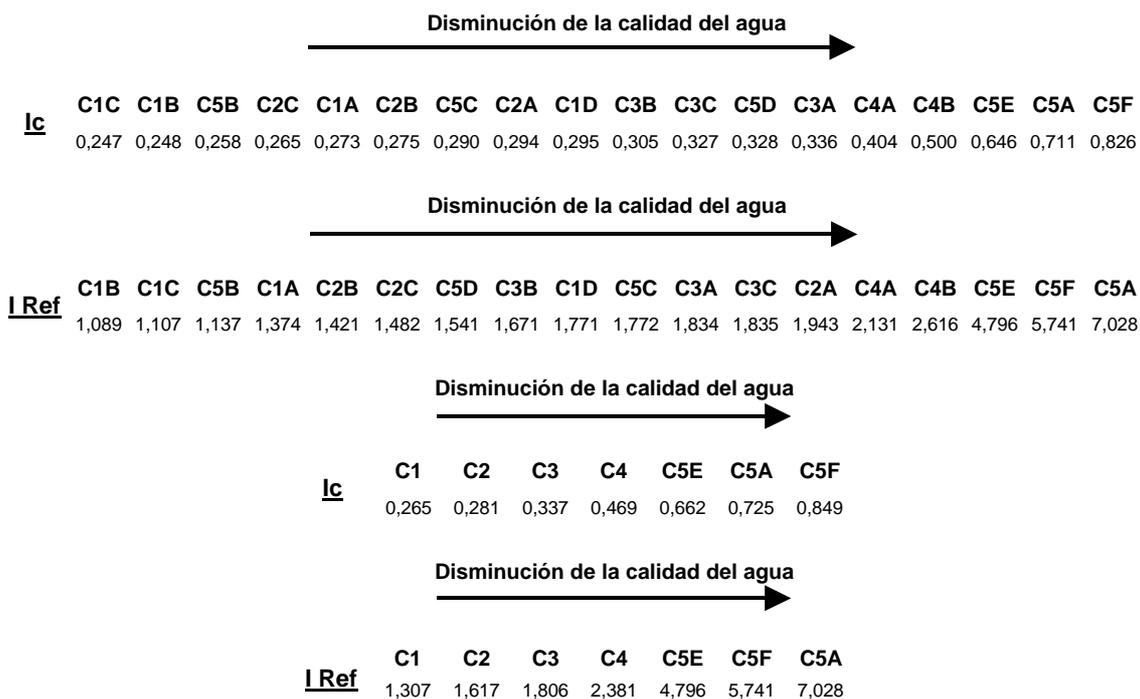
Tabla C II.74. I_c de la Bahía de Cádiz. Transectos

| Máx. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _c ¾ |
|----------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------------------|
| | N-NH4 | N-NO2 | N-NO3 | P-PO4 | P | Si | Cl a | CT | SS | |
| | 0,193 | 0,023 | 0,434 | 0,051 | 0,250 | 0,527 | 3,667 | 33,83 | 166,50 | |
| | ¾Ratio To Maximum¾ | | | | | | | | | ¾I _c ¾ |
| C1 | 0,104 | 0,217 | 0,136 | 0,098 | 0,272 | 0,213 | 0,252 | 0,917 | 0,180 | 0,265 |
| C2 | 0,145 | 0,174 | 0,203 | 0,157 | 0,236 | 0,258 | 0,273 | 0,910 | 0,176 | 0,281 |
| C3 | 0,124 | 0,348 | 0,092 | 0,196 | 0,368 | 0,461 | 0,336 | 0,910 | 0,194 | 0,337 |
| C4 | 0,135 | 0,783 | 0,069 | 0,275 | 0,652 | 0,639 | 0,536 | 0,950 | 0,183 | 0,469 |
| C5A | 1,000 | 0,609 | 1,000 | 0,569 | 0,768 | 0,343 | 1,000 | 0,913 | 0,324 | 0,725 |
| C5E | 0,472 | 0,696 | 0,417 | 0,725 | 0,800 | 0,825 | 0,809 | 0,983 | 0,234 | 0,662 |
| C5F | 0,580 | 1,000 | 0,138 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,918 | 1,000 | 1,000 | 0,849 |

Tabla C II.75. I_{Ref} de la Bahía de Cádiz. Transectos

| Ref. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _{Ref} ¾ |
|----------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|---------------------|
| | N-NH4 | N-NO2 | N-NO3 | P-PO4 | P | Si | Cl a | CT | SS | |
| | 0,005 | 0,010 | 0,050 | 0,010 | 0,075 | 0,050 | 1,000 | 28,00 | 75,00 | |
| | ¾Ratio To Maximum¾ | | | | | | | | | ¾I _{Ref} ¾ |
| C1 | 4,000 | 0,500 | 1,180 | 0,500 | 0,907 | 2,240 | 0,925 | 1,108 | 0,400 | 1,307 |
| C2 | 5,600 | 0,400 | 1,760 | 0,800 | 0,787 | 2,720 | 1,000 | 1,099 | 0,391 | 1,617 |
| C3 | 4,800 | 0,800 | 0,800 | 1,000 | 1,227 | 4,860 | 1,233 | 1,100 | 0,431 | 1,806 |
| C4 | 5,200 | 1,800 | 0,600 | 1,400 | 2,173 | 6,740 | 1,967 | 1,148 | 0,405 | 2,381 |
| C5A | 38,600 | 1,400 | 8,680 | 2,900 | 2,560 | 3,620 | 3,667 | 1,104 | 0,720 | 7,028 |
| C5E | 18,200 | 1,600 | 3,620 | 3,700 | 2,667 | 8,700 | 2,967 | 1,187 | 0,520 | 4,796 |
| C5F | 22,400 | 2,300 | 1,200 | 5,100 | 3,333 | 10,540 | 3,367 | 1,208 | 2,220 | 5,741 |

Una vez obtenidos los índices de calidad y de contaminación, se han ordenado las estaciones de muestreo para visualizar mejor la variación espacial de la calidad del agua en la Bahía de Cádiz.



Representación gráfica de los índices obtenidos en la Bahía de Cádiz

Índice de contaminación en la Bahía de Cádiz

El rango de valores encontrado en los I_c muestra como existe una gran variación espacial en la calidad de las aguas en la Bahía de Cádiz (I_c C1C= 0,247 – I_c C5F= 0,908).

En los diagramas de índices ordenados se observa como esta variabilidad está asociada a la morfología de la bahía distinguiéndose dos zonas de acuerdo con la posición y el orden relativo que toman las estaciones en función del I_c.

La primera zona está formada por las estaciones interiores y el saco interno de la bahía hasta el estrecho de Puntales. Así tenemos las aguas de peor calidad en el caño Sancti Petri a la altura del puente Zuazo

(C5F), estación que presenta un alto índice de contaminación. Las dos siguientes estaciones son por orden, la estación situada en el Río Guadalete (C5A) y en el caño Sancti Petri próximo a su desembocadura en la Bahía de Cádiz (C5E). Las siguientes estaciones muestran una gran diferencia en los I_c respecto a las anteriores. Son las correspondientes a C4 apareciendo ordenadas desde la más interior (C4B) a la más exterior (C4A). Posteriormente y con valores de I_c muy parecidos, se agrupan las estaciones del transecto C3 junto con C5D (estación de localización geográfica intermedia entre C4A y C3).

La segunda zona estaría formada por el resto de estaciones, esto es, las estaciones situadas en el saco exterior de la Bahía de Cádiz. Todas ellas presentan valores muy similares del índice y por tanto la posición relativa entre éstas no es relevante. Notar solamente que las dos estaciones de peor calidad de este grupo son C1D (coincidente con la zona de influencia del emisario submarino de la EDAR *Las Galeras* de El Puerto de Santa María) y C2A (zona de influencia de la desembocadura del Guadalete). C1C y C1B son las estaciones que presentan aguas de mayor calidad.

Respecto al índice calculado para los transectos globales, se observa la misma tendencia descrita para las estaciones. En este caso, se diferencian ligeramente C1 y C2, presentando C1 aguas de mejor calidad.

C1A o C2A son las estaciones situadas en posiciones más exteriores y por tanto deberían ser representativas del agua de mayor calidad de la Bahía de Cádiz. Sin embargo, en el análisis individualizado de los parámetros físico-químicos se observó altas concentraciones en uno o varios parámetros quedando reflejado en los valores de I_c . Si bien existe un cierto empeoramiento de la calidad de las aguas en estas estaciones respecto a otras de mayor calidad (C1B y C1C), la magnitud de esta variación es poco significativa y por tanto cualquiera de las estaciones situadas a la izquierda de este diagrama podría considerarse como estación de referencia de la Bahía de Cádiz.

Índice respecto a los valores de referencia en la Bahía de Cádiz

Para este índice no se obtiene una zonificación tan clara como la obtenida con el I_c . Si bien coinciden los extremos, esto es, las estaciones que presentan mejor (C1B, C1C, C5B) y peor (C5A, C5F, C5E, C4B y C4A) calidad de las aguas, en el grupo de estaciones de calidad intermedia se observa un cierto desorden. Para este índice la estación C5A es la que presenta aguas de peor calidad, y la estación C1B la que tiene mejor calidad. La estación exterior C1A vuelve a no presentar el agua de mejor calidad, por tanto, la selección de ésta como estación de referencia podría no ser adecuado.

Respecto al índice calculado en cada transecto global, los resultados coinciden con los obtenidos en el I_c excepto en las estaciones C5A y C5E las cuales cambian el orden apareciendo C5E como más contaminada.

4.6.3. ÍNDICES DE CALIDAD EN EL RÍO IRO

Se ha calculado el I_c y el I_{Ref} en las aguas del Río Iro incluyendo las mediciones realizadas en Santi Petri. Las siguientes tablas muestran los resultados:

Tabla C II.76. I_c del Río Iro

| Máx. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _c ¾ |
|----------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|-------|-------------------|
| | N-NH4 | N-NO2 | N-NO3 | P-PO4 | P | Si | Cl a | CT | SS | |
| | 5,805 | 0,080 | 0,463 | 1,312 | 1,679 | 1,932 | 44,022 | 56,70 | 96,00 | |
| | ¾Ratio To Maximum¾ | | | | | | | | | |
| I1 | 1,000 | 1,000 | 0,380 | 0,920 | 1,000 | 0,541 | 1,000 | 1,000 | 0,177 | 0,780 |
| I2 | 0,475 | 0,851 | 0,629 | 0,499 | 0,588 | 0,266 | 0,762 | 0,840 | 0,617 | 0,614 |
| I3 | 0,438 | 0,721 | 0,842 | 1,000 | 0,940 | 1,000 | 0,592 | 0,855 | 1,000 | 0,821 |
| I4 | 0,484 | 0,801 | 0,768 | 0,467 | 0,437 | 0,223 | 0,560 | 0,809 | 0,987 | 0,615 |
| I5 | 0,447 | 0,765 | 0,779 | 0,456 | 0,501 | 0,143 | 0,434 | 0,815 | 0,961 | 0,589 |
| I6 | 0,347 | 0,831 | 1,000 | 0,371 | 0,253 | 0,231 | 0,453 | 0,798 | 0,857 | 0,571 |
| I7 | 0,173 | 0,905 | 0,895 | 0,204 | 0,233 | 0,143 | 0,430 | 0,692 | 0,875 | 0,505 |
| I8 | 0,096 | 0,941 | 0,828 | 0,123 | 0,126 | 0,150 | 0,384 | 0,704 | 0,841 | 0,466 |
| SP | 0,012 | 0,132 | 0,186 | 0,065 | 0,023 | 0,038 | 0,124 | 0,516 | 0,417 | 0,168 |

Tabla C II.77. I_{Ref.} del Río Iro

| Ref. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _{Ref.} ¾ |
|----------------|------------------------------|-------|-------|---------|--------|--------|--------|-------|-------|----------------------|
| | N-NH4 | N-NO2 | N-NO3 | P-PO4 | P | Si | Cl a | CT | SS | |
| | 0,005 | 0,010 | 0,050 | 0,010 | 0,075 | 0,050 | 1,000 | 28,00 | 75,00 | |
| | ¾Ratio To Reference¾ | | | | | | | | | |
| I1 | 1160,974 | 8,003 | 3,516 | 120,718 | 22,386 | 20,890 | 44,022 | 2,025 | 0,227 | 153,640 |
| I2 | 551,745 | 6,812 | 5,822 | 65,485 | 13,168 | 10,260 | 33,534 | 1,702 | 0,790 | 76,591 |
| I3 | 508,214 | 5,768 | 7,798 | 131,152 | 21,047 | 38,639 | 26,042 | 1,731 | 1,280 | 82,408 |
| I4 | 561,920 | 6,412 | 7,111 | 61,206 | 9,785 | 8,607 | 24,637 | 1,639 | 1,263 | 75,842 |
| I5 | 518,428 | 6,120 | 7,215 | 59,808 | 11,208 | 5,509 | 19,122 | 1,650 | 1,230 | 70,032 |
| I6 | 402,443 | 6,648 | 9,261 | 48,635 | 5,660 | 8,944 | 19,934 | 1,616 | 1,097 | 56,026 |
| I7 | 200,552 | 7,243 | 8,285 | 26,700 | 5,218 | 5,512 | 18,935 | 1,402 | 1,120 | 30,552 |
| I8 | 111,763 | 7,532 | 7,672 | 16,143 | 2,814 | 5,807 | 16,911 | 1,426 | 1,077 | 19,016 |
| SP | 14,217 | 1,059 | 1,726 | 8,487 | 0,507 | 1,484 | 5,466 | 1,044 | 0,533 | 3,836 |

Disminución de la calidad del agua

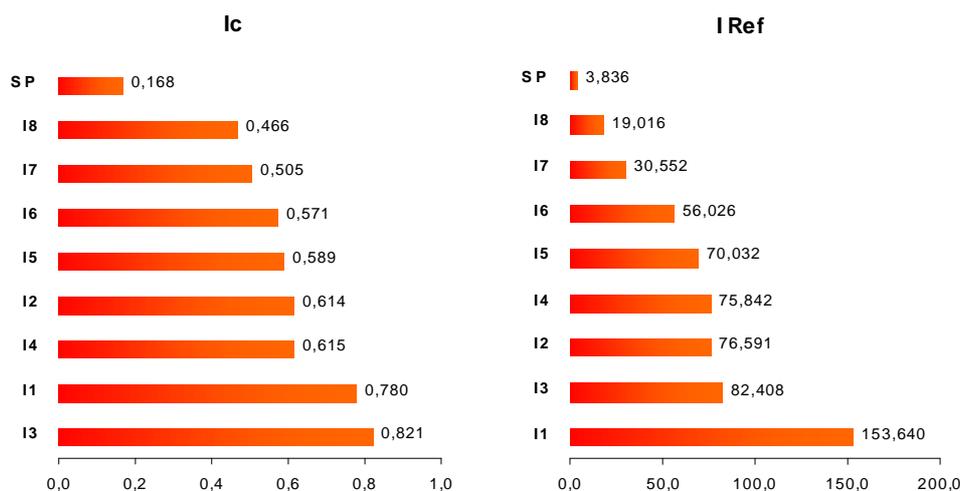


I_c SP I8 I7 I6 I5 I2 I4 I1 I3
 0,168 0,466 0,505 0,571 0,589 0,614 0,615 0,780 0,821

Disminución de la calidad del agua



I_{Ref.} SP I8 I7 I6 I5 I4 I2 I3 I1
 3,836 19,016 30,552 56,026 70,032 75,842 76,591 82,408 153,6



Representación gráfica de los índices obtenidos en el Río Iro

Índice de contaminación en el Río Iro

En los diagramas de índices ordenados se observa como la posición de las estaciones de muestreo está muy influenciada por la presencia del efluente de la EDAR *El Torno* en Chiclana de la Frontera y por la morfología y la circulación de aguas del río. Así, la estación que presenta aguas de peor calidad es la estación I3 que coincide con el área de dilución del efluente y las aguas del río. La siguiente estación es I1. Esta estación es la más interior del sistema y a pesar de estar aguas arriba del vertido, el efecto de la marea hace que durante un número importante de horas al día, el vertido en vez de desplazarse hacia la desembocadura, se desplace aguas arriba. Esta estación coincide además con el límite de mezcla del estuario y por tanto el efecto de la marea hace que la contaminación se concentre en este punto. Las siguientes estaciones son I2 e I4, situadas aguas arriba y abajo respectivamente del punto de vertido de la EDAR. Ambas estaciones presentan el mismo grado de contaminación. Después de este grupo, el índice ordena de forma secuencial las estaciones de muestreo de acuerdo con la morfología del río. Finalmente SP muestra aguas de gran calidad respecto a los valores obtenidos en las anteriores estaciones.

Índice respecto a los valores de referencia en el Río Iro

Mediante el cálculo de este índice es posible evaluar la calidad de SP respecto a los valores promedios de esta estación obtenida de una serie temporal de un año a los cuales se les ha denominado *valores de referencia*. Así pues, el alto valor del índice obtenido en esta estación indica variaciones temporales en la calidad de las aguas en Sancti Petri. Estos resultados permiten afirmar que **es más adecuado utilizar valores de referencia obtenidos a partir de una serie temporal, que los obtenidos por la estación de referencia de forma puntual.**

Respecto al índice calculado en el resto de estaciones cabe destacar los altos valores que presentan los índices indicando un **grado de contaminación elevado en las aguas del Río Iro**. Respecto a la variación relativa de la calidad de las aguas entre estaciones, para este índice aparece la estación I1 como muy contaminada seguida de la estación I3, I4 e I2 presentan un grado de contaminación similar, y de forma diferenciada, el resto de estaciones ordenadas en la misma secuencia que la obtenida con Ic.

4.6.4. ÍNDICES DE CALIDAD EN LA BAHÍA DE ALGECIRAS

Los índices calculados en la Bahía de Algeciras se muestran en las siguientes tablas. Para el cálculo del transecto AI2 se ha suprimido la estación AI 2A debido a la gran distorsión que podría ocasionar a los índices calculados en las diferentes estaciones.

Tabla C II.78. I_c de la Bahía de Algeciras. Estaciones de muestreo

| Máx. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _c ¾ |
|----------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------|
| | N-NH4 | N-NO2 | N-NO3 | P-PO4 | P | Si | Cl a | CT | SS | |
| | 0,772 | 0,015 | 0,390 | 0,302 | 0,415 | 0,247 | 4,278 | 34,76 | 48,40 | |
| | ¾Ratio To Maximum¾ | | | | | | | | | ¾I _c ¾ |
| AI 1B | 0,014 | 1,000 | 1,000 | 0,002 | 0,043 | 0,356 | 0,530 | 0,867 | 1,000 | 0,535 |
| AI 1C | 0,001 | 0,067 | 0,123 | 0,002 | 0,001 | 0,142 | 0,530 | 0,901 | 0,031 | 0,200 |
| AI 1D | 0,001 | 0,067 | 0,205 | 0,002 | 0,070 | 0,198 | 0,530 | 0,864 | 0,001 | 0,215 |
| AI 1E | 0,001 | 0,067 | 0,182 | 0,002 | 0,157 | 0,109 | 0,530 | 0,859 | 0,072 | 0,220 |
| AI 2B | 1,000 | 0,467 | 0,195 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,764 | 1,000 | 0,001 | 0,714 |
| AI 2C | 0,012 | 0,467 | 0,721 | 0,002 | 0,039 | 0,279 | 0,404 | 0,853 | 1,000 | 0,419 |
| AI 2D | 0,013 | 0,600 | 0,459 | 0,002 | 0,039 | 0,324 | 0,489 | 0,843 | 0,979 | 0,416 |
| AI 2E | 0,001 | 0,333 | 0,390 | 0,002 | 0,060 | 0,134 | 0,356 | 0,830 | 0,698 | 0,312 |
| AI 2F | 0,001 | 0,200 | 0,410 | 0,002 | 0,171 | 0,126 | 0,399 | 0,833 | 0,052 | 0,244 |
| AI 2G | 0,001 | 0,067 | 0,054 | 0,002 | 0,001 | 0,186 | 0,399 | 0,839 | 0,083 | 0,181 |
| AI 2H | 0,001 | 0,067 | 0,003 | 0,002 | 0,001 | 0,097 | 0,399 | 0,840 | 0,072 | 0,165 |
| AI 2I | 0,001 | 0,067 | 0,100 | 0,002 | 0,063 | 0,154 | 0,807 | 0,831 | 0,000 | 0,225 |
| AI 3A | 0,001 | 0,067 | 0,003 | 0,002 | 0,001 | 0,170 | 0,807 | 0,837 | 0,103 | 0,221 |
| AI 3B | 0,018 | 0,333 | 0,995 | 0,002 | 0,053 | 0,255 | 0,455 | 0,854 | 0,981 | 0,439 |
| AI 3C | 0,001 | 0,067 | 0,200 | 0,002 | 0,027 | 0,109 | 0,455 | 0,890 | 0,001 | 0,195 |
| AI 3D | 0,001 | 0,067 | 0,005 | 0,002 | 0,920 | 0,101 | 0,455 | 0,848 | 0,176 | 0,286 |
| AI 3E | 0,001 | 0,067 | 0,090 | 0,002 | 0,001 | 0,178 | 0,725 | 0,849 | 0,041 | 0,217 |

Tabla C II.79. I_{Ref.} de la Bahía de Algeciras. Estaciones de muestreo

| Ref. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _{Ref.} ¾ |
|----------------|------------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|----------------------|
| | N-NH4 | N-NO2 | N-NO3 | P-PO4 | P | Si | Cl a | CT | SS | |
| | 0,005 | 0,010 | 0,050 | 0,010 | 0,075 | 0,050 | 1,000 | 28,00 | 75,00 | |
| | ¾Ratio To Reference¾ | | | | | | | | | ¾I _{Ref.} ¾ |
| AI 1B | 2,200 | 1,500 | 7,800 | 0,050 | 0,240 | 1,760 | 2,269 | 1,076 | 0,645 | 1,949 |
| AI 1C | 0,200 | 0,100 | 0,960 | 0,050 | 0,007 | 0,700 | 2,269 | 1,119 | 0,020 | 0,603 |
| AI 1D | 0,200 | 0,100 | 1,600 | 0,050 | 0,387 | 0,980 | 2,269 | 1,072 | 0,001 | 0,740 |
| AI 1E | 0,200 | 0,100 | 1,420 | 0,050 | 0,867 | 0,540 | 2,269 | 1,066 | 0,047 | 0,729 |
| AI 2B | 154,400 | 0,700 | 1,520 | 30,200 | 5,533 | 4,940 | 3,269 | 1,241 | 0,001 | 22,423 |
| AI 2C | 1,800 | 0,700 | 5,620 | 0,050 | 0,213 | 1,380 | 1,727 | 1,059 | 0,645 | 1,466 |
| AI 2D | 2,000 | 0,900 | 3,580 | 0,050 | 0,213 | 1,600 | 2,093 | 1,047 | 0,632 | 1,346 |
| AI 2E | 0,200 | 0,500 | 3,040 | 0,050 | 0,333 | 0,660 | 1,522 | 1,030 | 0,451 | 0,865 |
| AI 2F | 0,200 | 0,300 | 3,200 | 0,050 | 0,947 | 0,620 | 1,707 | 1,034 | 0,033 | 0,899 |
| AI 2G | 0,200 | 0,100 | 0,420 | 0,050 | 0,007 | 0,920 | 1,707 | 1,042 | 0,053 | 0,500 |
| AI 2H | 0,200 | 0,100 | 0,020 | 0,050 | 0,007 | 0,480 | 1,707 | 1,043 | 0,047 | 0,406 |
| AI 2I | 0,200 | 0,100 | 0,780 | 0,050 | 0,347 | 0,760 | 3,453 | 1,031 | 0,000 | 0,747 |
| AI 3A | 0,200 | 0,100 | 0,020 | 0,050 | 0,007 | 0,840 | 3,453 | 1,040 | 0,067 | 0,642 |
| AI 3B | 2,800 | 0,500 | 7,760 | 0,050 | 0,293 | 1,260 | 1,946 | 1,061 | 0,633 | 1,811 |
| AI 3C | 0,200 | 0,100 | 1,560 | 0,050 | 0,147 | 0,540 | 1,946 | 1,104 | 0,001 | 0,628 |
| AI 3D | 0,200 | 0,100 | 0,040 | 0,050 | 5,093 | 0,500 | 1,946 | 1,053 | 0,113 | 1,011 |
| AI 3E | 0,200 | 0,100 | 0,700 | 0,050 | 0,007 | 0,880 | 3,100 | 1,054 | 0,027 | 0,680 |

Tabla C II.80. I_c de la Bahía de Algeciras. Transectos

| Máx. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _c ¾ |
|--------------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------|
| | N-NH4 | N-NO2 | N-NO3 | P-PO4 | P | Si | Cl a | CT | SS | |
| | 0,772 | 0,010 | 0,267 | 0,302 | 0,415 | 0,247 | 3,269 | 34,76 | 36,40 | |
| ¾Ratio To Maximum¾ | | | | | | | | | | ¾I _c ¾ |
| AI1 | 0,093 | 1,000 | 1,000 | 0,079 | 0,135 | 0,336 | 0,728 | 0,881 | 0,898 | |
| AI2 (*) | 0,008 | 0,600 | 0,652 | 0,017 | 0,055 | 0,223 | 0,570 | 0,841 | 1,000 | 0,441 |
| AI 3 | 0,013 | 0,400 | 0,933 | 0,017 | 0,118 | 0,206 | 0,675 | 0,856 | 0,896 | 0,457 |
| AI 1E | 1,000 | 0,700 | 0,285 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 1,000 | 0,001 | 0,776 |

Tabla C II.81. I_{Ref} de la Bahía de Algeciras. Transectos

| Ref. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _{Ref} ¾ |
|--------------------|------------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|---------------------|
| | N-NH4 | N-NO2 | N-NO3 | P-PO4 | P | Si | Cl a | CT | SS | |
| | 0,005 | 0,010 | 0,050 | 0,010 | 0,075 | 0,050 | 1,000 | 28,00 | 75,00 | |
| ¾Ratio To Maximum¾ | | | | | | | | | | ¾I _{Ref} ¾ |
| AI1 | 14,400 | 1,000 | 5,340 | 2,400 | 0,747 | 1,660 | 2,380 | 1,094 | 0,436 | |
| AI2 (*) | 1,200 | 0,600 | 3,480 | 0,500 | 0,307 | 1,100 | 1,863 | 1,044 | 0,485 | 1,175 |
| AI 3 | 2,000 | 0,400 | 4,980 | 0,500 | 0,653 | 1,020 | 2,205 | 1,063 | 0,435 | 1,473 |
| AI 1E | 154,400 | 0,700 | 1,520 | 30,200 | 5,533 | 4,940 | 3,269 | 1,241 | 0,001 | 22,423 |

Disminución de la calidad del agua



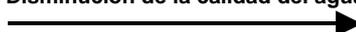
I_c AI2G AI2F AI3B AI1B AI1C AI3D AI1D AI2I AI2H AI3E AI2E AI3C AI2D AI2C AI2B AI3A AI1A AI1E
0,165 0,181 0,195 0,200 0,215 0,217 0,220 0,221 0,225 0,241 0,244 0,286 0,312 0,416 0,419 0,439 0,535 0,714

Disminución de la calidad del agua



I_{Ref} AI2G AI2F AI1B AI3B AI2I AI3D AI1D AI1C AI2H AI2D AI3E AI2E AI3C AI2C AI2B AI3A AI1A AI1E
0,406 0,500 0,603 0,628 0,642 0,680 0,729 0,740 0,747 0,865 0,881 0,899 1,011 1,346 1,466 1,811 1,949 22,423

Disminución de la calidad del agua



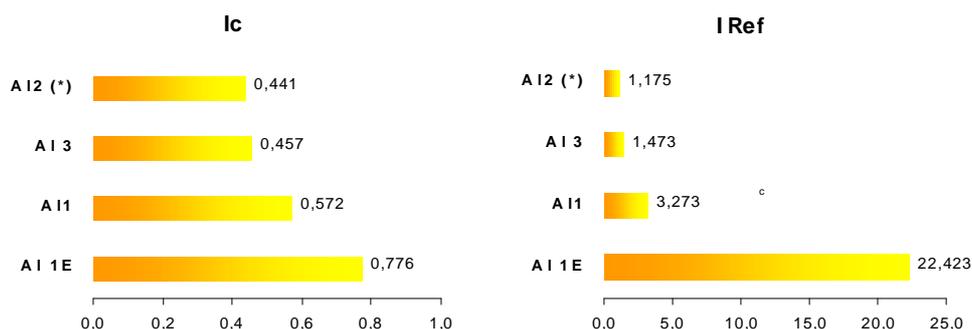
I_c AI2 (*) AI 3 AI1 AI 1E
0,441 0,457 0,572 0,776

Disminución de la calidad del agua



I Ref AI2 (*) AI 3 AI1 AI 1E
1,175 1,473 3,273 22,423

AI2(*) Transecto AI2 sin la estación AI 2A



Representación gráfica de los índices de calidad obtenidos en la Bahía de Algeciras

Índice de contaminación en la Bahía de Algeciras

El índice de contaminación obtenido en la Bahía de Algeciras muestra como **la estación que presenta aguas de peor calidad es la estación AI 1E situada en una de las bocanas del puerto de Algeciras**. Las siguientes estaciones son las situadas más próximas a las desembocaduras de los ríos Palmones y Guadarranque (AI 1A y AI 3A). Finalmente, se obtiene que las aguas de mejor calidad se localizan en la zona central de la bahía. El resto de estaciones podrían diferenciarse en dos grupos, un grupo de estaciones de peor calidad próximos a la desembocadura de los ríos, y un grupo de estaciones situados en la zona central-externa de la bahía que presentan mejor calidad. La estación AI 2I es la situada más exterior mostrando aguas de calidad intermedia.

Para la Bahía de Algeciras tampoco se cumple la regla general de que la estación situada en una posición más exterior es la estación de aguas más limpias. En general, el amplio tráfico marítimo presenta hace difícil el establecimiento de un área de referencia.

Respecto a la calidad de los transectos y estaciones puntuales, la estación AI 1E es la que presenta un mayor grado de contaminación. **Los transectos situados más próximos a tierra, esto es, AI1 y AI3 presentan aguas de peor calidad frente al transecto central AI2.**

Índice respecto a los valores de referencia en la Bahía de Algeciras

Los resultados muestran una disposición de estaciones muy similar al obtenido con el I_c , esto es, la estación que presenta un mayor grado de contaminación es la estación AI 1E mostrando un valor del índice muy elevado. Por el contrario, la estación de aguas de mejor calidad es AI 2G con un valor del índice muy bajo y diferenciándose claramente del resto de estaciones.

El orden de los transectos es el mismo que el obtenido para la el índice de contaminación. Destacar los elevados valores obtenidos en AI 1E.

4.6.5. ÍNDICES DE CALIDAD EN EL GOLFO DE CÁDIZ

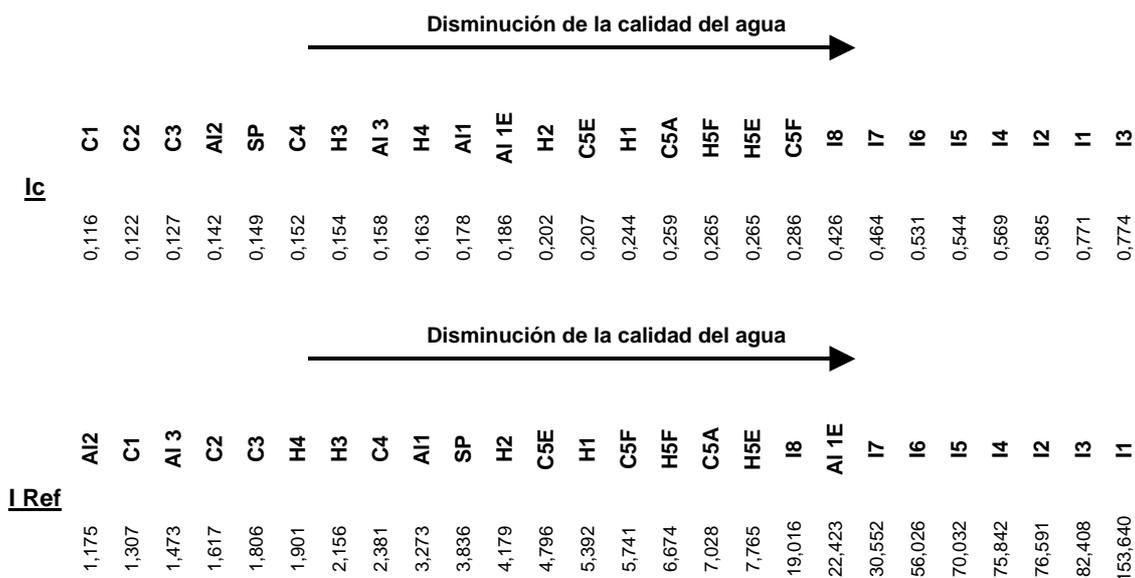
Finalmente, y con objeto de establecer una escala general de calidad de aguas en diferentes áreas litorales del Golfo de Cádiz, se ha calculado los dos índices de calidad a partir de los valores representativos de cada transecto más algunas estaciones de especial interés. Las tablas siguientes muestran los resultados obtenidos de los subíndices y de los índices de calidad. Además, y con objeto de visualizar gráficamente los resultados se incluyen dos diagramas de barras representando estos índices.

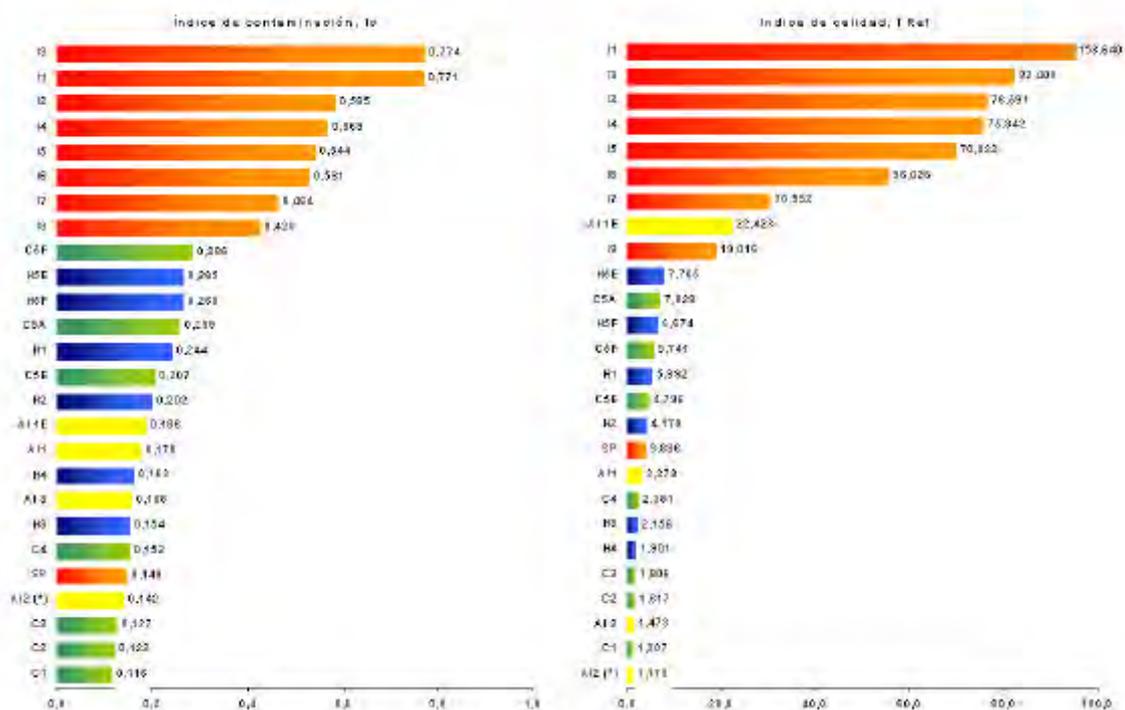
Tabla C II.82. I_c del Golfo de Cádiz

| Máx. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _c ¾ |
|----------------|------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|-------|--------|-------------------|
| | N-NH4 | N-NO2 | N-NO3 | P-PO4 | P | Si | Cl a | CT | SS | |
| | 5,805 | 0,080 | 0,463 | 1,312 | 1,679 | 1,932 | 44,022 | 56,70 | 166,50 | |
| | ¾Ratio To Maximum¾ | | | | | | | | | |
| H1 | 0,009 | 0,362 | 0,194 | 0,091 | 0,220 | 0,089 | 0,254 | 0,527 | 0,450 | 0,244 |
| H2 | 0,009 | 0,275 | 0,160 | 0,074 | 0,178 | 0,030 | 0,157 | 0,566 | 0,367 | 0,202 |
| H3 | 0,003 | 0,112 | 0,106 | 0,033 | 0,119 | 0,023 | 0,095 | 0,543 | 0,350 | 0,154 |
| H4 | 0,002 | 0,050 | 0,188 | 0,018 | 0,161 | 0,037 | 0,064 | 0,562 | 0,384 | 0,163 |
| H5E | 0,021 | 0,412 | 0,272 | 0,094 | 0,240 | 0,190 | 0,306 | 0,459 | 0,395 | 0,265 |
| H5F | 0,011 | 0,312 | 0,279 | 0,116 | 0,273 | 0,174 | 0,281 | 0,503 | 0,435 | 0,265 |
| C1 | 0,003 | 0,062 | 0,127 | 0,004 | 0,041 | 0,058 | 0,021 | 0,547 | 0,180 | 0,116 |
| C2 | 0,005 | 0,050 | 0,190 | 0,006 | 0,035 | 0,070 | 0,023 | 0,543 | 0,176 | 0,122 |
| C3 | 0,004 | 0,100 | 0,086 | 0,008 | 0,055 | 0,126 | 0,028 | 0,543 | 0,194 | 0,127 |
| C4 | 0,004 | 0,225 | 0,065 | 0,011 | 0,097 | 0,174 | 0,045 | 0,567 | 0,183 | 0,152 |
| C5A | 0,033 | 0,175 | 0,937 | 0,022 | 0,114 | 0,094 | 0,083 | 0,545 | 0,324 | 0,259 |
| C5E | 0,016 | 0,200 | 0,391 | 0,028 | 0,119 | 0,225 | 0,067 | 0,586 | 0,234 | 0,207 |
| C5F | 0,019 | 0,287 | 0,130 | 0,039 | 0,149 | 0,273 | 0,076 | 0,597 | 1,000 | 0,286 |
| AI1 | 0,012 | 0,125 | 0,577 | 0,018 | 0,033 | 0,043 | 0,054 | 0,540 | 0,196 | 0,178 |
| AI2 (*) | 0,001 | 0,075 | 0,376 | 0,004 | 0,014 | 0,028 | 0,042 | 0,516 | 0,219 | 0,142 |
| AI 3 | 0,002 | 0,050 | 0,538 | 0,004 | 0,029 | 0,026 | 0,050 | 0,525 | 0,196 | 0,158 |
| AI 1E | 0,133 | 0,087 | 0,164 | 0,230 | 0,247 | 0,128 | 0,074 | 0,613 | 0,000 | 0,186 |
| I1 | 1,000 | 1,000 | 0,380 | 0,920 | 1,000 | 0,541 | 1,000 | 1,000 | 0,102 | 0,771 |
| I2 | 0,475 | 0,851 | 0,629 | 0,499 | 0,588 | 0,266 | 0,762 | 0,840 | 0,356 | 0,585 |
| I3 | 0,438 | 0,721 | 0,842 | 1,000 | 0,940 | 1,000 | 0,592 | 0,855 | 0,577 | 0,774 |
| I4 | 0,484 | 0,801 | 0,768 | 0,467 | 0,437 | 0,223 | 0,560 | 0,809 | 0,569 | 0,569 |
| I5 | 0,447 | 0,765 | 0,779 | 0,456 | 0,501 | 0,143 | 0,434 | 0,815 | 0,554 | 0,544 |
| I6 | 0,347 | 0,831 | 1,000 | 0,371 | 0,253 | 0,231 | 0,453 | 0,798 | 0,494 | 0,531 |
| I7 | 0,173 | 0,905 | 0,895 | 0,204 | 0,233 | 0,143 | 0,430 | 0,692 | 0,505 | 0,464 |
| I8 | 0,096 | 0,941 | 0,828 | 0,123 | 0,126 | 0,150 | 0,384 | 0,704 | 0,485 | 0,426 |
| SP | 0,012 | 0,132 | 0,186 | 0,065 | 0,023 | 0,038 | 0,124 | 0,516 | 0,240 | 0,149 |

Tabla C II.83. I_{Ref.} del Golfo de Cádiz

| Ref. (mg/L) | ¾Parámetros físico-químicos¾ | | | | | | | | | ¾I _{Ref.} ¾ |
|----------------|------------------------------|----------------|----------------|----------------|------------|-------------|---------------|-------------|-------------|----------------------|
| | N-NH4 0,005 | N-NO2 0,010 | N-NO3 0,050 | P-PO4 0,010 | P 0,075 | Si 0,050 | Cl a 1,000 | CT 28,00 | SS 75,00 | |
| | ¾Ratio To Reference¾ | | | | | | | | | |
| H1 | 10,200 | 2,900 | 1,800 | 12,000 | 4,920 | 3,440 | 11,200 | 1,066 | 0,999 | 5,392 |
| H2 | 10,200 | 2,200 | 1,480 | 9,700 | 3,987 | 1,160 | 6,925 | 1,146 | 0,814 | 4,179 |
| H3 | 3,600 | 0,900 | 0,980 | 4,300 | 2,667 | 0,880 | 4,200 | 1,099 | 0,776 | 2,156 |
| H4 | 2,800 | 0,400 | 1,740 | 2,300 | 3,613 | 1,440 | 2,825 | 1,139 | 0,853 | 1,901 |
| H5E | 23,800 | 3,300 | 2,520 | 12,300 | 5,373 | 7,340 | 13,450 | 0,929 | 0,877 | 7,765 |
| H5F | 12,600 | 2,500 | 2,580 | 15,200 | 6,107 | 6,740 | 12,350 | 1,019 | 0,966 | 6,674 |
| C1 | 4,000 | 0,500 | 1,180 | 0,500 | 0,907 | 2,240 | 0,925 | 1,108 | 0,400 | 1,307 |
| C2 | 5,600 | 0,400 | 1,760 | 0,800 | 0,787 | 2,720 | 1,000 | 1,099 | 0,391 | 1,617 |
| C3 | 4,800 | 0,800 | 0,800 | 1,000 | 1,227 | 4,860 | 1,233 | 1,100 | 0,431 | 1,806 |
| C4 | 5,200 | 1,800 | 0,600 | 1,400 | 2,173 | 6,740 | 1,967 | 1,148 | 0,405 | 2,381 |
| C5A | 38,600 | 1,400 | 8,680 | 2,900 | 2,560 | 3,620 | 3,667 | 1,104 | 0,720 | 7,028 |
| C5E | 18,200 | 1,600 | 3,620 | 3,700 | 2,667 | 8,700 | 2,967 | 1,187 | 0,520 | 4,796 |
| C5F | 22,400 | 2,300 | 1,200 | 5,100 | 3,333 | 10,540 | 3,367 | 1,208 | 2,220 | 5,741 |
| AI1 | 14,400 | 1,000 | 5,340 | 2,400 | 0,747 | 1,660 | 2,380 | 1,094 | 0,436 | 3,273 |
| AI2 (*) | 1,200 | 0,600 | 3,480 | 0,500 | 0,307 | 1,100 | 1,863 | 1,044 | 0,485 | 1,175 |
| AI 3 | 2,000 | 0,400 | 4,980 | 0,500 | 0,653 | 1,020 | 2,205 | 1,063 | 0,435 | 1,473 |
| AI 1E | 154,400 | 0,700 | 1,520 | 30,200 | 5,533 | 4,940 | 3,269 | 1,241 | 0,001 | 22,423 |
| I1 | 1160,974 | 8,003 | 3,516 | 120,718 | 22,386 | 20,890 | 44,022 | 2,025 | 0,227 | 153,640 |
| I2 | 551,745 | 6,812 | 5,822 | 65,485 | 13,168 | 10,260 | 33,534 | 1,702 | 0,790 | 76,591 |
| I3 | 508,214 | 5,768 | 7,798 | 131,152 | 21,047 | 38,639 | 26,042 | 1,731 | 1,280 | 82,408 |
| I4 | 561,920 | 6,412 | 7,111 | 61,206 | 9,785 | 8,607 | 24,637 | 1,639 | 1,263 | 75,842 |
| I5 | 518,428 | 6,120 | 7,215 | 59,808 | 11,208 | 5,509 | 19,122 | 1,650 | 1,230 | 70,032 |
| I6 | 402,443 | 6,648 | 9,261 | 48,635 | 5,660 | 8,944 | 19,934 | 1,616 | 1,097 | 56,026 |
| I7 | 200,552 | 7,243 | 8,285 | 26,700 | 5,218 | 5,512 | 18,935 | 1,402 | 1,120 | 30,552 |
| I8 | 111,763 | 7,532 | 7,672 | 16,143 | 2,814 | 5,807 | 16,911 | 1,426 | 1,077 | 19,016 |
| SP | 14,217 | 1,059 | 1,726 | 8,487 | 0,507 | 1,484 | 5,466 | 1,044 | 0,533 | 3,836 |





Representación gráfica de los índices de calidad ambiental obtenidos en el Golfo de Cádiz

(Azul: Ría de Huelva; Verde: Bahía de Cádiz; Rojo: Río Iro; Amarillo: Bahía de Algeciras)

Índice de contaminación en el Golfo de Cádiz

Los índices de contaminación calculados muestran una clasificación de las áreas ambientales en función de la calidad de las aguas. El **área litoral más contaminado con gran diferencia es el Río Iro**. Hay que resaltar que esta zona presenta todos los máximos valores de los parámetros (excepto los sólidos en suspensión que presentan el máximo en C5F). Las elevadas concentraciones de los parámetros físico-químicos medidas en el Río Iro producen una gran influencia en el valor de los índices del resto de transectos y estaciones. Estas altas concentraciones son especialmente críticas en los parámetros *amonio* y *fosfatos*, parámetros muy indicativos de la presencia de vertidos de aguas residuales y que ejercen una gran influencia en el cálculo de los índices. Estos parámetros hacen que sea la estación I3 la que presente una mayor grado de contaminación, seguido de I1, I2 y el resto de estaciones del Río Iro en el mismo orden que se disponen hacia la desembocadura.

Siguiendo el orden de transectos se observa una relación de estaciones de valores de I_c similares. De este grupo, la estación más contaminada es C5F seguidas de H5E, H5F, C5A. Estas son las **estaciones interiores de la Ría de Huelva y de la Bahía de Cádiz**. Después de este grupo aparece H1, C5E, H2 y Al1E. Otro grupo de transectos/estaciones de calidad intermedia sería Al1, H4, H3, y C4. Finalmente **las estaciones de mejor calidad son SP, Al2, C3, C2 y C1** siendo este último el transecto que representa las aguas de mayor calidad

Índice respecto a valores de referencia en el Golfo de Cádiz

Los índices calculados respecto a los valores de referencia indican una gran variabilidad espacial debido a la gran diferencia de valores que existe entre las estaciones más contaminadas y las de mayor calidad. Los valores que presentan estos índices son los mismos que los obtenidos en el análisis individual de cada zona, en este apartado únicamente se ordenan las estaciones y transectos. El Río Iro vuelve a aparecer como la zona más contaminada, y los transectos de Cádiz y Algeciras los de mayor calidad.

5. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES DEL CAPÍTULO II

A lo largo de los diferentes apartados correspondientes a cada una de las áreas ambientales, se han ido subrayando las conclusiones obtenidas en cada uno de estos estudios.

El objetivo de este apartado es realizar unas consideraciones finales acerca de las herramientas utilizadas en estos estudios y sintetizar brevemente el comportamiento de cada una de las áreas ambientales en función de las conclusiones aportadas en cada apartado.

5.1. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES ACERCA DE LAS HERRAMIENTAS DE ANÁLISIS

Variables fisicoquímicas

- I. Si bien en las diferentes normativas de calidad de aguas existen un amplio número y tipos de parámetros para el control de la calidad de las aguas, el conjunto de variables seleccionadas en estos estudios, permiten caracterizar correctamente las aguas litorales e identificar los procesos que ocurren en estas aguas (procesos naturales, de contaminación, de dilución, etc). Aunque se han seleccionado un conjunto de variables de análisis relativamente "fácil" en el laboratorio, los resultados han permitido identificar las "zonas problemáticas" de cada área litoral hacia las cuales se deben intensificar los programas de seguimiento ambiental respecto a estas mismas variables o respecto a otras sustancias o compuestos más peligrosos desde el punto de vista ambiental.

Diagramas de representación de los resultados

Se ha seleccionado un conjunto adecuado de representaciones gráficas a partir de las cuales se han obtenido observaciones útiles que permiten corroborar los resultados o conclusiones obtenidos mediante técnicas de análisis de datos más rigurosas o formales.

- II. Tanto los histogramas de frecuencia como los diagramas de datos ordenados, permiten obtener una visión adecuada de la forma de la distribución de los resultados en las áreas ambientales.
- III. Los diagramas de box-whisker representados permiten obtener tres tipos de información al mismo tiempo: la variabilidad espacial y temporal del parámetro, y la forma de la distribución de los resultados. De este último tipo de información, hay que destacar la identificación de valores anómalos y extremos.

Técnicas de análisis de datos

Se han seleccionado un conjunto adecuado de técnicas de análisis de los resultados analíticos obtenidos.

- IV. Individualmente, cada técnica de análisis aporta conclusiones del conjunto de resultados. Mediante el uso conjunto de estas técnicas ha sido posible corroborar las conclusiones obtenidas en cada una de ellas, cuando no complementarse o apoyarse unas en otras para obtener una conclusión final.
- V. Las matrices de correlación y el análisis cluster de variables han permitido corroborar y complementar los resultados obtenidos en el análisis de componentes principales. Este último ha sido especialmente útil para identificar los procesos dominantes en cada área ambiental

- VI. Mediante el análisis cluster de casos ha sido posible realizar una zonificación de cada área basada en similitudes en la composición de las aguas de las estaciones de toma de muestra. Esta zonificación, junto con las representaciones gráficas, permiten obtener una visión de qué zonas de cada área litoral son especialmente problemáticas y qué zonas presentan aguas de buena calidad.

Índices de calidad

- VII. Se han definido dos índices de calidad ambiental -*Índice de contaminación (Ic)* y el *Índice respecto a los valores de referencia (I Ref)* a partir de un número reducido de variables físico-químicas de análisis rutinario en aguas litorales y fórmulas matemáticas sencillas.
- VIII. Para el *I Ref* se han definido unos *valores de referencia* frente al tradicional concepto de *estación de referencia*. Los índices así definidos son más versátiles puesto que permiten realizar comparaciones espaciales y temporales sin necesidad de volver a redefinir o calcular los diferentes subíndices.
- IX. Se ha realizado una evaluación de cuatro áreas litorales en función de los dos índices de calidad ambiental. En este análisis se ha observado que los resultados obtenidos y la clasificación de estaciones son muy similares. Sin embargo cada uno de ellos aporta una ventaja frente al otro que hace que el uso conjunto de ambos sea el más adecuado.
- X. Por una parte, el *Ic* presenta la ventaja de que los subíndices están normalizados. De esta forma se evita el peso de algún parámetro de concentración extrema en el computo del índice. Además, al estar normalizados, el índice sólo puede variar entre 0 y 1, lo cual facilita la visualización e interpretación de los resultados. Por el contrario, este índice presenta la desventaja de que una vez definido, si quisiéramos incluir nuevas estaciones de muestreo en el estudio y éstas presentaran valores máximos en algún parámetro, habría que recalcular todos los subíndices de nuevo.
- XI. Respecto al *I Ref*, puesto que cada subíndice se ha calculado respecto a unos valores de referencia, es posible realizar comparaciones temporales del índice. Otra ventaja que presenta es que en caso de ser necesario incluir en el análisis nuevas estaciones de muestreo, no habría que recalcular todos los índices. La desventaja que presenta este índice es que al no estar normalizados los valores de cada parámetro, puede ocurrir que algún parámetro que presente una concentración anómala puede influir con un gran peso en el resultado del índice.
- XII. A partir de los resultados obtenidos con ambos índices se puede concluir que las estaciones que presentan aguas de mejor calidad no coinciden con las estaciones localizadas en puntos más exteriores o en aguas más abiertas. Por ello, se reitera de nuevo en que es más adecuado, y útil (comparaciones temporales) prefijar unos *valores de referencia*.

5.2. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES RESPECTO A LAS ÁREAS LITORALES ESTUDIADAS

Conclusiones respecto a la Ría de Huelva

- XIII. A partir de los diagramas representados se concluye que existe una variabilidad marcada de todos los parámetros a lo largo de la Ría de Huelva. Los focos de contaminación se localizan fundamentalmente en las estaciones interiores y en el punto de confluencia de ambos ríos. Esta contaminación disminuye progresivamente hacia la desembocadura.
- XIV. En relación a la especiación del nitrógeno, los altos porcentajes de amonio en las aguas indican un alto grado de contaminación reciente por aguas residuales urbanas sin depurar.
- XV. En relación con las correlaciones obtenidas mediante el método de Pearson, hay que significar el alto número y la significancia de estas correlaciones. Los resultados obtenidos permiten concluir que la matriz de correlación explica procesos de contaminación/dilución de los vertidos a la ría.
- XVI. Mediante los resultados obtenidos a partir del cluster de casos ha sido posible zonificar la ría de Huelva en tres tramos:
- Un primer tramo correspondiente a las estaciones interiores al cual se le asocia una alta contaminación
 - Un segundo tramo correspondiente a los transeptos H1 y H2 al cual se le asocia una alta-media contaminación
 - Un tercer tramo correspondiente a los transeptos H3 y H4 a los cuales se les asocia una media-baja contaminación. Este tramo representa la calidad de las aguas de la ría antes de su desembocadura en el sistema exterior.

Estos resultados se corroboran con las apreciaciones realizadas en los diagramas de box-whisker de cada parámetro.

- XVII. Mediante el análisis de componentes principales se han podido identificar los procesos que ocurren en la ría. Los más importantes son los procesos de contaminación por metales, y de contaminación por vertidos con altos niveles de nutrientes (posiblemente vertidos urbanos). De estos dos, el primero es el más significativo desde un punto de vista estadístico. Estos resultados están corroborados por la matriz de correlaciones y por el cluster de variables.
- XVIII. Se han aplicado dos índices de calidad ambiental con el objeto de clasificar la calidad ambiental de los transeptos y estaciones especiales seleccionados en la Bahía de Cádiz. Los resultados obtenidos corroboran y complementan la zonificación realizada mediante el análisis cluster de casos.

Conclusiones respecto a la Bahía de Cádiz

- XIX. A partir de los diagramas representados se concluye que existe una variabilidad espacial marcada de los parámetros distinguiendo claramente dos zonas:
- Estaciones interiores
 - Resto de estaciones

El transepto C4 se consideraría una situación intermedia entre ambas zonas para algunos parámetros.

- XX. En relación a la especiación del nitrógeno, se observan dos comportamientos:
- Para estaciones exteriores, la especie mayoritaria son los nitratos. Por tanto, las aguas pertenecientes a estas estaciones pueden considerarse aguas abiertas de buena circulación.
 - En las estaciones interiores, la especie mayoritaria es el amonio indicando por tanto, un alto grado de contaminación por aguas residuales urbanas sin depurar.
- XXI. En relación con las correlaciones obtenidas mediante el método de Pearson, se han observado correlaciones muy similares a las obtenidas en la Ría de Huelva. Al ser la Bahía de Cádiz un sistema más abierto y por tanto con mayor capacidad de dilución, estas relaciones son menos potentes, y por tanto, presentan menor coeficiente de correlación.
- XXII. Mediante los resultados obtenidos a partir del cluster de casos ha sido posible zonificar la Bahía de Cádiz en tres áreas:
- Un primer área que en este caso estaría formado por un conjunto de estaciones interiores aisladas: C5A, C5E y C5F.
 - Un segundo área que se corresponde con el saco interior de la bahía.
 - Un tercer área, de mayor extensión que los anteriores, que estaría formado por la zona del estrecho de Puntales el cual delimita el saco interno del saco externo de la Bahía (transecto C3), más los dos transectos exteriores, C1 y C2.

Estos resultados se corroboran con las apreciaciones realizadas en los diagramas de box-whisker de los parámetro.

- XXIII. Mediante el análisis de componentes principales se han podido identificar algunos procesos que ocurren en la Bahía de Cádiz. Todos estos procesos contribuyen de forma similar a la varianza global de los datos. Por tanto, se ha concluido de forma general que en la Bahía de Cádiz no existen grandes fenómenos de contaminación identificados. Los procesos con más significancia se identifican con procesos degradativos naturales. También, se identifican fenómenos de contaminación por metales, y fenómenos de contaminación por aguas residuales recientes (en aguas interiores) y menos recientes (en aguas más abiertas).
- XXIV. Se han aplicado dos índices de calidad ambiental con el objeto de clasificar la calidad ambiental de los transectos y estaciones especiales seleccionados e la ría de Huelva. Los resultados obtenidos corroboran y complementan la zonificación realizada mediante el análisis cluster de casos.

Conclusiones respecto al estuario del Río Iro

- XXV. En el estuario del Río Iro, independientemente de cualquier análisis de datos realizados, hay que destacar los elevados niveles de contaminación de sus aguas, fundamentalmente en términos de nitrógeno y fósforo.
- XXVI. A partir de los diagramas representados se concluye que existe una variabilidad marcada de todos los parámetros a lo largo del estuario del río Iro. El principal foco de contaminación está perfectamente identificado en la estación I3 la cual se recuerda que coincide con el área de influencia de la dilución del efluente de la EDAR "El Torno" con las aguas del estuario.
- XXVII. En relación a la especiación del nitrógeno, la especie dominante es el amonio, indicando claramente un alto grado de contaminación por aguas residuales urbanas.

XXVIII. En relación con las correlaciones obtenidas mediante el método de Pearson, hay que significar que para esta área litoral se obtiene la matriz de correlaciones con mayor número de correlaciones y más potentes. Destacar también que la mayoría de ellas son positivas.

Por tanto, se concluye que la matriz de correlación explica perfectamente los fenómenos de contaminación/dilución del vertido en las aguas del estuario del Río Iro.

XXIX. Mediante los resultados obtenidos a partir del cluster de casos ha sido posible zonificar el estuario en tres tramos:

- El primer tramo está formado por la estación I3.
- Un segundo tramo o grupo de estaciones estarían formadas por aquellas inmediatamente situadas a los lados de I3, esto es, I1, I2 e I4.
- El último tramo estaría formado por el resto de estaciones, disponiéndose en orden decreciente de contaminación, en el mismo orden descendente del sentido del río.

Estos resultados se corroboran con las apreciaciones realizadas en los diagramas de box-whisker de cada parámetro.

XXX. Mediante el análisis de componentes principales se han podido identificar los procesos que ocurren en el río. Fundamentalmente el proceso que predomina en el sistema es la contaminación de las aguas por el vertido de aguas residuales de la EDAR. En el factor que identifica este fenómeno se aglutinan todos los parámetros excepto nitritos y nitratos los cuales conforman el segundo factor identificando por tanto, fenómenos de transformación química en las aguas.

XXXI. Se han aplicado dos índices de calidad ambiental con el objeto de clasificar la calidad ambiental de las estaciones seleccionadas en el estuario del río Iro. Los resultados obtenidos corroboran y complementan la zonificación realizada mediante el análisis cluster de casos.

Conclusiones respecto a la Bahía de Algeciras

XXXII. En la Bahía de Algeciras, independientemente de cualquier análisis de datos realizados, hay que destacar tres hechos que se producen de forma general en toda la Bahía excepto en la estación AI1E:

- Altos niveles de nitratos respecto a los niveles normales en sistemas abiertos. En términos de nitrógeno se corresponde con aguas *eutróficas* y/o *hipertróficas* según la clasificación realizada para aguas marinas de diferentes estados tróficos (Hakanson, 1994; Smith *et al.*, 1999).
- Bajos niveles de fósforo. Respecto a la clasificación realizada por los anteriores autores, se clasificaría en términos de fósforo como *oligotrófica*.
- Gran número de observaciones por debajo de los límites de detección de los métodos en diferentes parámetros: amonio, nitritos, fosfatos y fósforo.

El gran número de observaciones no detectadas y los altos niveles de estos parámetros en AI 1E identifican a ésta, como uno de los puntos de mayor contaminación de la Bahía.

XXXIII. En relación a la especiación del nitrógeno, la especie dominante es el nitrato llegando incluso a alcanzar porcentajes de concentración respecto a las otras especies de nitrógeno de más del 90%.

- XXXIV. En relación con las correlaciones obtenidas mediante el método de Pearson, hay que significar el escaso número de correlaciones obtenidas y los bajos coeficientes de correlación. Las pocas correlaciones obtenidas están posiblemente muy condicionadas a los resultados de AI1E.
- XXXV. En función de los resultados obtenidos en las representaciones gráficas y en la matriz de correlación, se postula acerca de la posible existencia de una gran limitación por fósforo en la producción primaria de la Bahía de Algeciras. Esta limitación explica tanto los bajos niveles de fósforo como los altos niveles de nitrógeno. Además se corrobora con las correlaciones positivas entre clorofila y nitratos, y negativas entre clorofila y fósforo
- XXXVI. El cluster de casos zonifica la Bahía de Algeciras en tres zonas principales. Estas zonas ordenadas de menor a mayor calidad de las aguas son las siguientes:
- La estación AI 1E de forma aislada.
 - Zona próxima al polo industrial de Algeciras, junto con las estaciones más próximas a las desembocaduras de los ríos Palmones y Guadarranque.
 - Resto de estaciones
- XXXVII. En el análisis de componentes principales se han identificado fundamentalmente dos factores. Respecto al primer factor se ha concluido que éste más que representar un conjunto de variables, representa la estación de muestreo AI 1E.
- XXXVIII. Otro proceso importante que ocurre en la bahía es la contaminación por nitratos.
- XXXIX. Se han aplicado dos índices de calidad ambiental con el objeto de clasificar la calidad ambiental de los transectos y estaciones especiales seleccionados en la Bahía de Algeciras. Los resultados obtenidos corroboran y complementan la zonificación realizada mediante el análisis cluster de casos.

Estudio comparativo de las zonas litorales de estudio

- XL. La representación conjunta de las cuatro áreas litorales en un mismo diagrama de dispersión y diagrama de box-whisker permiten apreciar de forma visual y comparada, los diferentes comportamientos, distribución de resultados, valores anómalos, etc. de cada parámetro en las cuatro áreas litorales.
- Para cada parámetro se han incluido el estudio comparado en cada apartado correspondiente. De forma general y en función del conjunto de resultados se puede decir que:
- XLI. El estuario del Río Iro presenta las aguas de peor calidad, diferenciándose considerablemente del resto de áreas litorales.
- XLII. De las tres áreas restantes, se observa que las aguas de la Ría de Huelva presenta aguas de peor calidad que las aguas de la Bahía de Cádiz. El caso de la Bahía de Algeciras es particular debido a los altos contenidos en nitrógeno y bajos en fósforo. Por tanto, se considerará como un área de calidad intermedia entre las aguas de la Ría de Huelva y las aguas de la Bahía de Cádiz.
- XLIII. Los índices de calidad obtenidos para el conjunto de estaciones y transectos del Golfo de Cádiz corroboran los resultados obtenidos mediante el análisis cluster de casos.

XLIV. Finalmente, y como conclusión global de este capítulo, se comprueba que **las cuatro áreas litorales han sido identificadas como áreas litorales particulares**, con diferentes niveles de nutrientes, y por tanto **con aguas de diferente calidad**.

Esta última conclusión es muy importante en el desarrollo de este trabajo de investigación, puesto que ha condicionado el diseño de algunos de los objetivos que se presentan en los siguientes capítulos. Desde un punto de vista ambiental es muy interesante llegar a esta conclusión, puesto que actualmente **la normativa de calidad de aguas vigente en Andalucía** (Orden 14.02.97; BOJA, 1997), si bien distinguen entre cuatro tipos de aguas (*Capítulo I*) y por tanto cuatro grados de protección, esta distinción se realiza desde la globalidad y no desde las particularidades de cada área ambiental. Para las áreas litorales de circulación de aguas limitadas, esta **no es la mejor estrategia a seguir en el control de la contaminación de estas áreas**, puesto que la morfología y el número y tipo de fuentes de contaminación son muy condicionantes de la calidad de sus aguas.

Finalmente, decir que en el *Capítulo IV* se han diseñado valores guía de calidad partiendo de la conclusión global obtenida en este capítulo y utilizando los diferentes gráficos y comentarios obtenidos en el estudio comparativo de las áreas litorales de estudio.

CAPÍTULO III

ENSAYOS DE TOXICIDAD

Resumen

En este capítulo se exponen la metodología de ensayo y los resultados obtenidos en los tests de toxicidad realizados sobre una serie de compuestos específicos y sobre aguas receptoras pertenecientes a cuatro áreas litorales del Golfo de Cádiz.

Objetivos

Los objetivos que se pretenden cumplir con la elaboración de este capítulo son los siguientes:

ENSAYOS DE COMPUESTOS ESPECÍFICOS

- Establecer protocolos de ensayos de toxicidad para tres tipos de organismos marinos y diversos compuestos específicos en aguas litorales andaluzas en aplicación del Anexo V (apartado 1.2.6) de la Directiva 2000/60/CE, *Marco de Aguas*, basados en los procedimientos estandarizados de toxicidad.
- Aplicar esta metodología de ensayo con diferentes contaminantes contenidos en las diferentes legislaciones relativas a calidad de aguas marinas.
- Obtener los resultados ecotoxicológicos el conjunto de compuestos químicos.
- Modificar y aplicar la metodología de ensayo de toxicidad a uno de los compuestos seleccionados, al objeto de estudiar el efecto de la matriz de ensayo en los resultados ecotoxicológicos.

ENSAYOS DE AGUAS RECEPTORAS

- Establecer un protocolo de ensayo de microalgas marinas para aguas receptoras y efluentes con microalgas residentes en aguas litorales andaluzas
- Aplicar esta metodología de ensayo en cuatro áreas ambientales del Golfo de Cádiz
- Desarrollar indicadores y/o índices de calidad ambiental biológicos basados en estos ensayos

INDICE DEL CAPÍTULO III

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 2 |
| 2.1. LA TOXICIDAD EN EL MEDIO MARINO | 2 |
| 2.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD EN EL MEDIO ACUÁTICO..... | 4 |
| 2.2.1. ENSAYOS DE TOXICIDAD NORMALIZADOS EN AGUA DE MAR..... | 4 |
| 2.2.2. TERMINOLOGÍA UTILIZADA EN LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD..... | 6 |
| 2.3. ENSAYOS DE TOXICIDAD CON MICROALGAS MARINAS | 8 |
| 2.3.1. INTRODUCCIÓN A LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD CON PLANTAS..... | 8 |
| 2.3.2. NECESIDAD DE DATOS DE FITOTOXICIDAD..... | 9 |
| 2.3.3. HISTORIA DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO CON ALGAS | 10 |
| 2.3.4. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO | 11 |
| 2.3.5. ENSAYO Y MEDIO DE CULTIVO..... | 12 |
| 2.3.6. INÓCULO- DENSIDAD INICIAL DE CÉLULAS..... | 13 |
| 2.3.7. TEMPERATURA, LUZ Y PH | 13 |
| 2.3.8. DURACIÓN DEL TEST | 13 |
| 2.3.9. ESPECIES DE ENSAYO..... | 14 |
| 2.3.10. SENSIBILIDAD DE LAS ESPECIES DE ENSAYO | 14 |
| 2.3.11. PARÁMETRO DE RESPUESTA | 15 |
| 2.4. INTRODUCCIÓN A LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD CON CRUSTÁCEOS..... | 17 |
| 2.4.1. SELECCIÓN DEL ESTADIO DE VIDA ÓPTIMO PARA ENSAYOS DE TOXICIDAD..... | 17 |
| 2.4.2. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO | 19 |
| 2.5. INTRODUCCIÓN A LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD CON BACTERIAS MARINAS..... | 19 |
| 2.5.1.FUNDAMENTO TEÓRICO DEL ENSAYO DE BACTERIAS LUMINISCENTES | 20 |
| 2.6. ENSAYOS DE TOXICIDAD DE AGUAS RECEPTORAS | 21 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 23 |
| 3.1. PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO CON MICROALGAS MARINAS | 23 |
| 3.1.1 PRINCIPIOS GENERALES | 24 |
| 3.1.2. ALGAS UTILIZADAS | 24 |
| 3.1.3. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO | 26 |
| 3.1.3.1. MATERIAL Y EQUIPOS..... | 26 |
| 3.1.3.1.1. INCUBADORA | 26 |
| 3.1.3.1.2. RECIPIENTES DE CULTIVO | 26 |
| 3.1.3.1.3. RECIPIENTES DE ENSAYO..... | 26 |
| 3.1.3.1.4. MONOCULTIVOS..... | 26 |
| 3.1.3.1.5. AGUA DE MAR..... | 26 |
| 3.1.3.1.6. SOLUCIÓN NUTRIENTE | 27 |
| 3.1.3.1.7. INÓCULOS DE ENSAYO | 28 |
| 3.1.3.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD. PREPARACIÓN, MEDIDAS DEL CRECIMIENTO Y ANÁLISIS DE RESULTADOS | 28 |
| 3.1.3.2.1. PREENSAYOS DE CALIBRACIÓN..... | 28 |
| 3.1.3.2.1.1. Correlación de diferentes medidas de biomasa algal..... | 28 |
| 3.1.3.2.1.2. Obtención del inóculo óptimo de ensayo..... | 33 |
| 3.1.3.2.2. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO DE TOXICIDAD DE COMPUESTOS ESPECÍFICOS..... | 36 |
| 3.1.3.2.2.1. Resumen del procedimiento | 36 |
| 3.1.3.2.2.2. Medidas del crecimiento | 37 |
| 3.1.3.2.2.3. Tratamiento de los resultados..... | 37 |
| 3.1.3.2.2.3.1. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES NOEC Y LOEC | 40 |
| 3.1.3.2.2.3.1.1. <u>Ensayo de normalidad. Test de Shapiro Wilk</u> | 40 |
| 3.1.3.2.2.3.1.2. <u>Test para el estudio de la homogeneidad de la varianza</u> | 41 |

| | |
|---|-----|
| 3.1.3.2.2.3.1.3. Procedimiento de Dunnett..... | 42 |
| 3.1.3.2.2.3.2. ESTIMACIÓN DEL VALOR DE EC _P | 44 |
| 3.1.3.2.2.3.3. TRANSFORMACIÓN DE DATOS DE TOXICIDAD..... | 45 |
| 3.1.3.2.3. ENSAYOS DE TOXICIDAD DE VERTIDOS Y DE AGUAS RECEPTORAS..... | 46 |
| 3.1.3.2.3.1. Resumen del procedimiento..... | 46 |
| 3.1.3.2.3.2. Inóculo..... | 46 |
| 3.1.3.2.3.3. Diseño experimental..... | 46 |
| 3.1.3.2.3.4. Tratamiento de datos y resultados. Cálculo de la inhibición/estimulación del crecimiento microalgal..... | 47 |
| 3.2. PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO CON ARTEMIA..... | 48 |
| 3.2.1. INCUBACIÓN DE LOS QUISTES Y RECOLECCIÓN DE LOS NAUPLIOS..... | 48 |
| 3.2.2. PREPARACIÓN DEL ENSAYO..... | 48 |
| 3.2.3. STOCK DE QUISTES DE ARTEMIA..... | 49 |
| 3.2.4. TRATAMIENTO DE DATOS Y RESULTADOS..... | 49 |
| 3.2.4.1. MÉTODO PROBIT PARA LA DETERMINACIÓN DE LA LC ₅₀ | 51 |
| 3.3. PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO CON BACTERIAS MARINAS..... | 53 |
| 3.3.1. INSTRUMENTACIÓN..... | 53 |
| 3.3.2. PRINCIPIO DEL MÉTODO..... | 54 |
| 3.3.3. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO..... | 54 |
| 3.3.3.1. REACTIVACIÓN DE LAS BACTERIAS LUMINISCENTES..... | 54 |
| 3.3.3.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS..... | 54 |
| 3.3.3.3. REALIZACIÓN DEL ENSAYO..... | 55 |
| 3.3.3.4. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS..... | 55 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 57 |
| 4.1. ENSAYOS DE TOXICIDAD DE COMPUESTOS ESPECÍFICOS..... | 57 |
| 4.1.1 TOXICIDAD DEL TENSIOACTIVO ANIÓNICO LAS..... | 58 |
| 4.1.1.1. ENSAYOS CON MICROALGAS MARINAS..... | 58 |
| 4.1.1.2. ENSAYOS CON CRUSTÁCEOS. ARTEMIA..... | 72 |
| 4.1.1.3. ENSAYOS CON BACTERIAS MARINAS. VIBRIO FISCHERI..... | 75 |
| 4.1.1.4. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL ENSAYO DEL LAS..... | 77 |
| 4.1.2. TOXICIDAD DE NP9EO..... | 79 |
| 4.1.2.1. ENSAYOS CON MICROALGAS MARINAS..... | 79 |
| 4.1.2.2. ENSAYOS CON CRUSTÁCEOS. ARTEMIA..... | 88 |
| 4.1.2.3. ENSAYOS CON BACTERIAS MARINAS. VIBRIO FISCHERI..... | 90 |
| 4.1.2.4. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL ENSAYO DEL NP9EO..... | 91 |
| 4.1.3. TOXICIDAD DEL FENOL..... | 93 |
| 4.1.3.1. ENSAYOS CON MICROALGAS MARINAS..... | 93 |
| 4.1.3.2. ENSAYOS CON CRUSTÁCEOS. ARTEMIA..... | 103 |
| 4.1.3.3. ENSAYOS CON BACTERIAS MARINAS. VIBRIO FISCHERI..... | 105 |
| 4.1.3.4. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL ENSAYO DEL FENOL..... | 106 |
| 4.1.4. TOXICIDAD DE LINDANO..... | 109 |
| 4.1.4.1. ENSAYOS CON MICROALGAS MARINAS..... | 109 |
| 4.1.4.2. ENSAYOS CON CRUSTÁCEOS. ARTEMIA..... | 118 |
| 4.1.4.3. ENSAYOS CON BACTERIAS MARINAS. VIBRIO FISCHERI..... | 120 |
| 4.1.4.4. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL ENSAYO DEL LINDANO..... | 121 |
| 4.1.5. TOXICIDAD DE COBRE (II)..... | 123 |
| 4.1.5.1. ENSAYOS CON MICROALGAS MARINAS..... | 123 |
| 4.1.5.2. ENSAYOS CON CRUSTÁCEOS. ARTEMIA..... | 132 |
| 4.1.5.3. ENSAYOS CON BACTERIAS MARINAS. VIBRIO FISCHERI..... | 134 |
| 4.1.5.4. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL ENSAYO DEL LINDANO..... | 135 |
| 4.1.6. TOXICIDAD DE CADMIO (II)..... | 137 |
| 4.1.6.1. ENSAYOS CON MICROALGAS MARINAS..... | 137 |
| 4.1.6.2. ENSAYOS CON CRUSTÁCEOS. ARTEMIA..... | 145 |
| 4.1.6.3. ENSAYOS CON BACTERIAS MARINAS. VIBRIO FISCHERI..... | 148 |
| 4.1.6.4. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL ENSAYO DEL LINDANO..... | 149 |
| 4.1.7. TOXICIDAD DE ZINC(II)..... | 151 |
| 4.1.7.1. ENSAYOS CON MICROALGAS MARINAS..... | 151 |
| 4.1.7.2. ENSAYOS CON CRUSTÁCEOS. ARTEMIA..... | 159 |
| 4.1.7.3. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL ENSAYO DEL LINDANO..... | 162 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.8. CLASIFICACIÓN DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD | 163 |
| 4.1.9. ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL LAS E <i>ISOCHRYSIS GALBANA</i> EN AGUAS RECEPTORAS..... | 165 |
| 4.1.9.1. RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS DIVERSOS ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL LAS EN AGUAS RECEPTORAS..... | 165 |
| 4.1.9.1.1. ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL LAS E <i>I. GALBANA</i> . AGUA DE MAR SINTÉTICA | 166 |
| 4.1.9.1.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL LAS E <i>I. GALBANA</i> . RÍA DE HUELVA | 168 |
| 4.1.9.1.3. ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL LAS E <i>I. GALBANA</i> . BAHÍA DE CÁDIZ..... | 170 |
| 4.1.9.1.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL LAS E <i>I. GALBANA</i> . RÍO IRO..... | 172 |
| 4.1.9.1.5. ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL LAS E <i>I. GALBANA</i> . BAHÍA DE ALGECIRAS | 174 |
| 4.1.9.2. DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES | 176 |
| 4.1.9.3. DETERMINACIÓN DE LOS IC _p | 179 |
| 4.1.9.4. CONCLUSIONES OBTENIDAS A PARTIR DE ESTOS ESTUDIOS..... | 182 |
| 4.2. RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS DE AGUAS RECEPTORAS. OBTENCIÓN DEL ÍNDICE DE EUTROFIZACIÓN - I _E - | 183 |
| 4.2.1. ANÁLISIS DEL I _E | 183 |
| 4.2.1.1. EVOLUCIÓN TEMPORAL DEL I _E | 183 |
| 4.2.1.2. VARIACIÓN DEL I _E ENTRE ESPECIES DE ALGAS | 185 |
| 4.2.2. ANÁLISIS DE LOS I _E GLOBAL DE CADA ÁREA LITORAL DE ESTUDIO | 188 |
| 4.2.2.1. I _E EN LA RÍA DE HUELVA | 188 |
| 4.2.2.2. I _E EN LA BAHÍA DE CÁDIZ | 191 |
| 4.2.2.3. I _E EN EL RÍO IRO | 192 |
| 4.2.2.4. I _E EN LA BAHÍA DE ALGECIRAS | 194 |
| 4.2.2.5. I _E EN EL GOLFO DE CÁDIZ | 196 |
| 4.2.3. CONCLUSIONES OBTENIDAS A PARTIR DE ESTOS ESTUDIOS..... | 197 |
| 5. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES FINALES | 199 |
| 5.1. CONCLUSIONES RELATIVAS A LOS ENSAYOS DE COMPUESTOS ESPECÍFICOS | 199 |
| 5.2. CONCLUSIONES OBTENIDAS DE LOS ENSAYOS DE AGUAS RECEPTORAS..... | 201 |

1. INTRODUCCIÓN

Uno de los objetivos fundamentales de la presente memoria es realizar una propuesta de objetivos de calidad en aguas litorales andaluzas. Para establecer los criterios de calidad físico-químicos se ha realizado una caracterización completa de cuatro áreas litorales del Golfo de Cádiz y se han establecido los niveles actuales de nutrientes en estas aguas.

Ahora bien, el procedimiento para la elaboración de los criterios de calidad de compuestos específicos es más complejo y necesita de una base de datos de resultados toxicológicos en los cuales se fundamenten dichos criterios de calidad ambiental.

Hasta hace pocos años, la Comisión Europea que desarrolla y revisa las concentraciones máximas permitidas en vertidos y los objetivos de calidad en aguas marinas de diversos compuestos catalogados como peligrosos, utilizaba una base de datos para cada compuesto en la cual se recoge diversa información relativa al compuesto: propiedades físico-químicas, persistencia en el medio, bioacumulación, toxicidad, ecotoxicidad, etc. Si bien esta lista incluye datos relativos a ecotoxicidad en el medio acuático, los organismos de referencia son específicos de aguas continentales (*Daphnia magna*, *Selenastrum capricornotum*). Elaborar normas de calidad ambiental a partir de los resultados ecotoxicológicos que aportan estos organismos no es inadecuado como primer paso, sin embargo el progreso y el conocimiento que se ha desarrollado en la última década relativa a la toxicidad del medio marino ha fomentado en la Unión Europea la inquietud de revisar los estándares de calidad sustentados en bases de datos más adecuadas para el medio marino.

Para realizar esta revisión, la Comisión de la Unión Europea en el Anexo V de la Directiva 60/2000/CE, *Marco de Aguas*, propone unas directrices a seguir cuando se quieran establecer normas de calidad relativas al agua, los sedimentos o la biota. En relación con los tipos de datos de ecotoxicidad que son necesarios y los organismos que deben utilizarse establece lo siguiente:

(...) Si es posible, deberán obtenerse datos, tanto puntuales como correspondientes a un periodo prolongado en el tiempo, respecto de los taxones acuáticos de cuyos datos se disponga. El "conjunto de base" de taxones lo compone:

- Algas y/o macrófitos
- *Daphnia* u organismos representativos de las aguas saladas
- Peces (...)

Tal y como especifica la Directiva, no hay que limitarse a los taxones especificados. Cuantos más resultados se tengan de toxicidad, con mayor seguridad se estarán estableciendo normas de calidad ambiental. El presente capítulo no tiene por objeto cubrir todas las respuestas y todos los taxones "base" que recomienda la Directiva, pero sí se ha cubierto ampliamente el taxón correspondiente a las microalgas puesto que pensamos que es uno de los más significativos y versátil. La importancia que tienen las algas en el funcionamiento de los ecosistemas es indudable como se detallará más adelante. Solamente indicar en esta introducción, que todo compuesto que afecte directamente a los productores primarios estará afectando al resto de la cadena trófica.

La intención de este capítulo es la de establecer una metodología de ensayo con diferentes especies. Estas especies se han seleccionado tanto por su disponibilidad, como por la relativa facilidad de los ensayos. También se ha considerado la importancia de estos grupos taxonómicos en diversos aspectos. Algunas de las microalgas de ensayo se utilizan para la obtención de productos naturales. Otras son muy utilizadas en acuicultura marina, sector industrial que tiene una gran importancia en nuestro litoral. En la misma línea, el uso de la *Artemia* en acuicultura marina es indudable. La utilización de los quistes de resistencia que generan estos organismos ante condiciones adversas ha permitido tener siempre en stock y en cualquier época del año, una fuente importante de proteínas para las especies comerciales de

peces. Finalmente, cada vez está más extendido el uso del ensayo con bacterias luminiscentes para la evaluación rápida (menos de 30 minutos) de la toxicidad de compuestos, lixiviados, aguas residuales

2. ANTECEDENTES

2.1. LA TOXICIDAD EN EL MEDIO MARINO

El incremento de la producción y uso de sustancias potencialmente tóxicas, y la actuación del medio acuático como sumidero de muchas de ellas ha hecho que cada vez sea más necesario poder valorar los efectos de tales productos, no sólo sobre el hombre, sino también sobre los organismos y los ecosistemas.

La ecotoxicología es un campo de investigación reciente ya que surge hace sólo unas décadas a raíz, precisamente, de la preocupación por los problemas de contaminación o polución de las masas de agua epicontinentales. El interés por lo que ocurría en las aguas marinas no vendría hasta mucho más tarde, cuando se empezó a tomar conciencia de que la capacidad de dilución del mar no era infinita y que la bioacumulación de algunas sustancias podía acelerar los procesos de toxicidad.

La definición del "Grupo de Expertos en Aspectos Científicos de la Polución marina –GESAMP" de *polución* implica que para determinar los niveles tolerables de estas sustancias en los vertidos, puede establecerse un límite entre las concentraciones que son perjudiciales y las que son inocuas (Abel y Axiak, 1991). De este modo, el objetivo principal de los estudios ecotoxicológicos se transforma en valorar el efecto de los contaminantes sobre los seres vivos y así determinar qué niveles son admisibles o permisibles y qué niveles causarían daños a los recursos vivos. Esto conduce a la formulación de *estándares de calidad* del agua para la prevención de la polución.

Aunque en principio los planteamientos toxicológicos en el medio marino, como medio acuático, no han de ser muy diferentes de los de las aguas dulces, sin embargo, los ecotoxicólogos marinos se han encontrado con serios problemas a la hora de establecer estos estándares y los avances han sido muy inferiores a los de la ecotoxicología de las aguas dulces. Las diferencias ambientales entre ambos medios conllevan necesariamente enfoques particulares pero el desfase histórico entre las dos aproximaciones ha condicionado el desarrollo de planteamientos adecuados al medio marino, y como consecuencia de ello, muchos de los trabajos publicados en este campo en los últimos años presentan errores en el diseño experimental o en el análisis de los datos, empleando una metodología inadecuada o partiendo de planteamientos conceptuales erróneos (Abel y Axiak, 1991). De este modo, aunque puede encontrarse un volumen de trabajo substancial, una parte importante del mismo presenta poca utilidad para el seguimiento y control de la contaminación marina.

La principal diferencia entre el medio acuático dulce y el marino estriba en el mayor grado de dilución que es posible en este último, por lo que las concentraciones de los contaminantes en el mar a menudo son muy bajas. De este modo, mientras en las aguas dulces las concentraciones encontradas con frecuencia sobrepasan las letales o las subletales y puede trabajarse en el laboratorio con concentraciones que, siendo fáciles de manejar, se mantienen en los rangos reales, en el mar, incluso en zonas intensamente contaminadas como puertos y zonas de influencia de vertidos, las concentraciones se hacen rápidamente tan bajas que a menudo son inferiores a los límites de detección de los aparatos de medida y, por lo tanto, no son manejables en condiciones experimentales. Esto hace que muchos estudios convencionales de toxicidad letal y subletal realizadas sobre organismos marinos sean inutilizables de cara a su extrapolación a condiciones reales (Abel y Axiak, 1991).

En segundo lugar, es importante considerar la influencia del agua de mar como matriz en las características y comportamiento del contaminante. Hace tiempo que se ha observado que las concentraciones de los metales pesados en el agua de mar no sólo son muy bajas, sino que se encuentran varios órdenes de magnitud por debajo de sus concentraciones de equilibrio químico. Esto se debe al parecer, a procesos de precipitación,

sorción y sedimentación que favorecen su fijación en el sedimento. Sin embargo, se han publicado cientos de trabajos en la última década sin tener en cuenta que o bien las concentraciones empleadas eran demasiado altas respecto a las que realmente están expuestos los organismos, o bien en la práctica eran menores de las que el experimento suponía debido a su rápida desaparición de la columna de agua (Abel y Axiak, 1991).

Por otro lado, mientras que los efectos de las condiciones ambientales (pH, dureza del agua, temperatura, etc.) sobre la toxicidad de distintos productos hace tiempo que se vienen estudiando en las aguas dulces, por contra, no es así en el agua de mar. No obstante, hay que decir que muchas de estas condiciones ambientales son mucho más constantes en el mar.

Para muchos toxicólogos el propósito de sus investigaciones consiste en determinar las concentraciones o los niveles de contaminantes a las que éste es inocuo para los seres vivos o la tolerancia ecológica de los productos químicos, considerando que para todo producto tóxico hay una concentración por debajo de la cual éste deja de tener efectos nocivos (Hapke, 1981; Abel y Axiak, 1991; Rand, 1995). En la práctica, es difícil establecer estas cantidades umbrales y de hecho, a medida que las técnicas de medida se han hecho más precisas, pasándose de medir ppm a ppt, estas concentraciones "inocuas" son cada vez más bajas.

Sin embargo, en el fondo, ésta no es la cuestión más importante porque de hecho no conduce a nada conocer las concentraciones a las que un producto no es dañino. La protección y el desarrollo mantienen un delicado equilibrio y en última instancia lo que se busca es saber la concentración que sería aceptable en un caso dado. Por ejemplo, aunque se conociera la concentración a la cual un producto tóxico deja de ser dañino, no podemos esperar que se actúe regulando los vertidos de modo que nunca se superen estas concentraciones. En la práctica existen limitaciones técnicas, socioeconómicas y políticas que permiten que los vertidos superen estos niveles. No hay que limitarse entonces a establecer las concentraciones de inocuidad, sino que también hay que indicar explícitamente los peligros y las consecuencias derivadas del incremento en la concentración del contaminante en el medio ambiente, de modo que la decisión de los técnicos o los políticos se realice con conocimiento de causa.

Cuando se trata de vertidos complejos para los que con frecuencia existen tales limitaciones técnicas o económicas para su tratamiento completo, se debería establecer qué productos deben de ser eliminados en primer lugar, e incluso, como en el caso de los dispersantes de petróleo, conocer si los remedios son peores que la enfermedad y cuál de las opciones de tratamiento posibles causa menor impacto.

La herramienta más característica en los estudios ecotoxicológicos para alcanzar estos objetivos son las pruebas de toxicidad. En definitiva, este tipo de análisis se han llevado a cabo con distintos fines, desde establecer estándares de calidad de agua (definir los límites de inocuidad o las concentraciones aceptables de un contaminante), o para el seguimiento de efluentes y de aguas receptoras de vertidos, especialmente cuando contienen una mezcla compleja de productos químicos cuya composición precisa se desconoce o varía rápidamente, y por tanto un análisis químico podría ser complicado. Para estos casos, se ha comprobado que un "simple" ensayo de toxicidad puede ayudarnos a determinar el efecto que causaría sobre diferentes poblaciones biológicas (toxicidad, potencial de eutrofización) (Weber, 1993; Lewis *et al.*, 1994).

2.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD EN EL MEDIO ACUÁTICO

2.2.1. ENSAYOS DE TOXICIDAD NORMALIZADOS EN AGUA DE MAR

Dada la gran diversidad de plantas marinas y vida animal, se han usado cientos de especies en los ensayos de toxicidad. Sin embargo, relativamente muy pocos de éstos se han desarrollado formalmente y considerados ensayos normalizados para incorporarlos a los procedimientos regulativos de las normativas o textos legislativos. De hecho, basándose en la limitada información que existe actualmente acerca del cultivo en laboratorio, los ciclos de vida, la dieta y las posibles enfermedades de un gran número de las especies generalmente ensayadas en los ensayos de agua de mar, sólo un pequeño número de estos ensayos podrían considerarse como estándares.

En algunos documentos de la bibliografía, se pueden consultar revisiones exhaustivas acerca de protocolos de ensayos de toxicidad estandarizados publicados por diversos organismos gubernamentales y medioambientales (USEPA -Serie 850- *Ecological Effects Test Guidelines*; Rand, 1995; ECETOC, 2001). Estas revisiones están realizadas fundamentalmente para ensayos mono-específicos, esto es, utilizando una única especie en la realización del ensayo. La tabla C III.1 muestra los métodos más utilizados. Además de este listado, cualquier procedimiento estandarizado descrito para aguas continentales o dulces podría aplicarse en agua salada para estudios de exposición aguda o crónica. La única diferencia en los ensayos de agua salada son los organismos usados y la matriz salina utilizada en el ensayo.

La mayoría de los procedimientos enunciados se limitan a una respuesta aguda o un ensayo a corto plazo no superior a 4 días, y generalmente utilizando como especies de ensayo a peces e invertebrados para determinar la concentración letal media (LC_{50}) o la concentración efectiva media (EC_{50}) del material ensayado (p.e. un compuesto químico o un efluente). Al igual que con los ensayos de agua dulce y los ensayos a corto plazo mencionados anteriormente, es posible determinar los efectos umbrales (LOEL, NOEL y MATC) para cada respuesta biológica observada. Estos valores umbrales pueden determinarse también realizando un ensayo crónico para un ciclo de vida completo cuyo objetivo sea determinar el efecto de un material en la supervivencia, crecimiento, y reproducción. Estos ensayos para invertebrados de agua de mar pueden durar de 2 a 4 semanas y un mínimo de 6 meses para peces, por lo que al ser ensayos de tan larga duración implican un aumento en la dificultad del mismo y por consiguiente, sólo unos pocos de peces y especies de invertebrados pueden utilizarse rutinariamente en estos ensayos de ciclos de vida completos.

Para aguas continentales, las organizaciones de estandarización emplean generalmente en las evaluaciones de riesgo ambiental de compuestos químicos, ensayos con algas, crustáceos y peces. Éstos representan tres niveles tróficos -productores primarios, consumidores primarios y consumidores secundarios-, tres grupos taxonómicos -algas verdes, crustáceos y peces-, dos formas de vida (plancton y necton), y tres estrategias de alimentación -fotosíntesis, herbívoros filtradores y carnívoros- (ECETOC, 2001). Para estos propósitos, los organismos utilizados en los ensayos de ecotoxicidad marina pueden seleccionarse de la misma forma. En este sentido hay que resaltar que la Directiva 60/2000/CE Marco de Aguas indica esta misma selección, para los procedimientos de obtención de estándares de calidad ambiental para aquellos compuestos que puedan estar presentes en las aguas continentales, marinas y/o de transición del territorio de la Unión Europea.

En relación con los ensayos realizados sobre efluentes y aguas receptoras, en respuesta a las necesidades normativas y de control y seguimiento de estos efluentes, se han desarrollado algunos ensayos a corto-medio plazo (menor o igual que 7 a 9 días) para estimar efectos agudos y crónicos (Weber, 1993; Lewis, 1994).

Tabla C III.1. Ensayos de toxicidad de agua de mar (Rand, 1995, modificada)

| DESIGNACIÓN | TÍTULO |
|---------------|--|
| | Métodos Normalizados, Parte 8000 (APHA et al., 1992) |
| 8111 | Bioestimulación (Productividad algal) |
| 8112 | Procedimiento de ensayo de toxicidad para fitoplancton |
| 8310 | Procedimiento de ensayo de toxicidad para protozoos ciliados |
| 8410 | Procedimiento de ensayo de toxicidad de corales escleroactínidos |
| 8510 | Procedimiento de ensayo de toxicidad de anélidos |
| 8610 | Procedimiento de ensayo de toxicidad de moluscos |
| 8710 | Procedimiento de ensayo de toxicidad de microcrustáceos |
| 8712 | Procedimiento de ensayo de toxicidad de acartia |
| 8720 | Procedimiento de ensayo de toxicidad de macrocrustáceos |
| 8910 | Procedimiento de ensayo de toxicidad de peces |
| | ASTM (ASTM, 1993) |
| E-1191-90 | Guía para realizar ensayos de toxicidad durante el ciclo de vida en misidios |
| E-729-88a | Guía para realizar ensayos de toxicidad aguda con peces, macroinvertebrados, y anfibios |
| E-1241-92 | Guía para realizar ensayos de toxicidad durante estadios tempranos de vida de Peces |
| E-1440-91 | Guía para realizar ensayos de toxicidad aguda con el rotífero del género <i>Brachionus</i> (y rotíferos marinos y estuáricos) |
| E-724-89 | Guía para realizar ensayos de toxicidad agudos de tipo estáticos y de flujo continuo con embriones de cuatro especies de moluscos bivalvos de agua de mar |
| E-1463-92 | Guía para realizar ensayos de toxicidad agudos estáticos y de flujo continuo con misidios de la Costa Oeste de EEUU |
| E-1367-92 | Guía para realizar ensayos de toxicidad en sedimentos de 10 días de duración con anfípodos marinos y estuáricos |
| E-1192-88 | Guía para realizar ensayos de toxicidad aguda en efluentes acuosos con peces, macroinvertebrados y anfibios |
| E-1218-90 | Guía para realizar ensayos de toxicidad estática de 96-horas con microalgas |
| | Test Agudos en Efluentes de la EPA (U.S.EPA -Weber ed., 1991) |
| | Ensayos de toxicidad aguda en efluentes con <i>Mysidopsis bahia</i> |
| | Ensayos de toxicidad aguda en efluentes con <i>Cyprinodon variegatus</i> |
| | Ensayos de toxicidad aguda en efluentes con <i>Menidia</i> sp. |
| | Test Crónicos en Efluentes de la EPA (U.S.EPA -Weber ed., 1991) |
| 1004 | Método de supervivientes larvarios y ensayos de crecimiento de <i>Cyprinodon variegatus</i> |
| 1005 | Método de supervivientes embrio-larvales y ensayo de teratogeneicidad de <i>Cyprinodon variegatus</i> |
| 1006 | Método de supervivientes larvarios y crecimiento de <i>Menidia Beryllina</i> |
| 1007 | Método de supervivencia, crecimiento y ensayo de fecundidad de <i>Mysidopsis bahia</i> |
| 1008 | Método del ensayo de fertilización del erizo de mar <i>Arbacia punctulata</i> |
| 1009 | Método del ensayo de reproducción sexual algal de <i>Champia parvulata</i> |
| | EPA TSCA Procedimientos de toxicidad del Código de regulación Federal (TSCA, 1990) |
| 797.1050 | Ensayo de toxicidad aguda en algas |
| 797.1075 | Ensayo de toxicidad aguda en algas de agua dulce y marina |
| 797.1400 y 40 | Ensayo de toxicidad aguda en peces |
| 797.1520 y 60 | Ensayo de bioconcentración en peces |
| 797.1600 | Ensayo de toxicidad con estadios tempranos de peces |
| 797.1800 | Ensayo de toxicidad aguda en ostras |
| 797.1930 y 50 | Ensayo de toxicidad aguda con misidios (camarones) |
| 797.1970 | Ensayo de toxicidad aguda con peneidos |
| | EPA-FIFRA Procedimientos de toxicidad (US.EPA, 1985; 1986) |
| | Procedimiento de Evaluación Estándar: Ensayos de toxicidad aguda para organismos marinos y estuáricos: |
| | — Ensayo de toxicidad de 96-horas para peces estuáricos (EPA-540/9-85-009, 1985) |
| | — Test de Toxicidad de 96 horas para camarones (EPA-540/9-85-010, 1985) |
| | — Procedimiento de Evaluación Estándar: Test de Toxicidad Aguda para organismos marinos y estuáricos (Estudio de deposición de concha en moluscos de 96 horas y flujo abierto) (EPA- 540/1-85-011, 1985) |
| | — Procedimiento de Evaluación Estándar: Test de Toxicidad Aguda para organismos marinos y estuáricos (Estudio de embriones y larvas en moluscos de 48 horas) (EPA-540/9-86-012, 1986) |
| | — Procedimiento de Evaluación Estándar: Estadios tempranos de vida en peces (EPA-540/9-86-138, 1986) |
| | — Procedimiento de Evaluación Estándar: Test de Toxicidad durante el ciclo de vida en peces (EPA-540/9-86-137, 1986) |
| | — Procedimiento de Evaluación Estándar: Plantas no-vasculares: Crecimiento y Reproducción en Plantas Acuáticas -Nivel 1 y 2 (EPA 540/9-86-134, 1986) |
| | OECD Test Guidelines (OECD) |
| | No especifica procedimientos de ensayos de toxicidad en agua salada |
| | Medioambiente Canadá (Environment Canadá, 1992) |
| | Test de toxicidad aguda en sedimentos usando anfípodos marinos y de estuario |
| | Ensayo de fertilización con equinoideos |

2.2.2. TERMINOLOGÍA UTILIZADA EN LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD

Los ensayos de toxicidad incluyen una serie de términos y conceptos los cuales son necesarios definir previamente con objeto de poder realizar, analizar y comentar adecuadamente los resultados obtenidos en estos ensayos. En muchos casos, y sobre todo en los términos de expresión de la toxicidad, esta terminología son traducciones del término anglosajón, siendo más común la utilización de estos últimos.

Biomasa algal. Peso de las células de las algas por volumen de medio nutriente para un determinado periodo de tiempo.

CEM, concentración de efectos mínimos (LOEC, Lowest observed effect concentration). La menor concentración de tóxico o efluente ensayada en la cual se observan diferencias estadísticamente significativas respecto al crecimiento de la población control.

CENO, concentración de efectos no-observados (NOEC, Non observed effect concentration). La mayor concentración de tóxico o efluente ensayada en la cual no se observa un crecimiento significativamente diferente con respecto al crecimiento del control

CE_x, Concentración efectiva (EC_x, Effective concentration). La concentración estimada de un compuesto o efluente que reduce el parámetro de medida (p.e. crecimiento, mortalidad) un x por ciento relativo a la población control.

CI_x, Concentración de inhibición (IC_x, Inhibition concentration). La concentración estimada de un compuesto o efluente que inhibe el crecimiento algal un x por ciento relativo a la población control.

CL_x, Concentración letal (LC_x, Letal concentration). La concentración estimada de un compuesto o efluente que causa la muerte a un porcentaje x de la población relativo al control.

Clorosis. Decrecimiento del contenido de pigmentos que aparece como un tono amarillento en las plantas.

Concentración alguicida: concentración de un compuesto o efluente que es letal para toda la población.

Concentración alguistática: concentración de un compuesto o efluente que inhibe completamente el crecimiento de la población pero que permite que las especies de ensayo vuelvan a crecer cuando se resuspenden en un medio nutritivo sin que contenga el compuesto tóxico.

Cultivo axénico: Un cultivo puro que sólo contiene una cepa de especie de alga y no otro organismo.

Cultivo continuo. Cultivo en el cual el aporte de nutrientes es continuo y puede regularse con lo cual es posible controlar la velocidad de crecimiento de las algas y el desarrollo de la población.

Cultivo en discontinuo. Cultivo en el cual no se renueva el contenido en nutrientes y por lo tanto, decrece con el tiempo.

Cultivo unialgal: Un cultivo que contiene una especie de alga y también posiblemente contenga bacterias, protozoos y hongos.

E%, porcentaje de estimulación, biestimulación o sobrecrecimiento (S%, stimulation percent): La concentración de efluente o aguas receptoras que estimula el crecimiento algal un x por ciento en relación a la población de algas control. También puede expresarse en términos de concentración, es decir SC_x sería la concentración de tóxico, efluente o aguas receptoras que estimula el crecimiento algal un x por ciento respecto a la población control.

Fitotoxicidad. Toxicidad de contaminantes ambientales determinada con respecto al crecimiento y supervivencia de las plantas.

MATC, concentración máxima de tóxico aceptable (Maximum acceptable toxicant concentration).

NEC, concentración de no efecto (model –based no-effect concentración). Concentración de no efecto obtenida a partir de un modelo de extrapolación.

Nutriente. Sustancia específica que se necesita para el crecimiento de los organismos.

Nutriente básico. El nutriente que más se necesita para el crecimiento en comparación con las cantidades de otros.

Productividad primaria. Velocidad a la cual la energía luminica se transforma en materia orgánica mediante la actividad fotosintética y quimiosintética de las plantas.

Quemostato. Aparato utilizado para el cultivo continuo de poblaciones de algas.

Velocidad de crecimiento: Incremento en la biomasa o cél/mL en un determinado período de tiempo.

2.3. ENSAYOS DE TOXICIDAD CON MICROALGAS MARINAS

2.3.1. IMPORTANCIA DE LAS PLANTAS

Las comunidades de plantas son muy importantes para el funcionamiento de los ecosistemas de aguas continentales, estuarios y ecosistemas marinos. Las algas asociadas al plancton, esto es el fitoplancton, junto con el perifiton forman la base de la mayoría de las cadenas alimenticias, producen oxígeno, y tienen un papel clave en el ciclo de los nutrientes. Las plantas vasculares o macrófitas proporcionan el hábitat y refugio de gran número de formas de vida animal en zonas costeras y en ambientes acuáticos continentales, siendo parte muy importante de la actividad fotosintética y prácticamente el total de la biomasa fitoplanctónica frente a las algas planctónicas.

Las plantas también intervienen en el control de la calidad química y física de las aguas naturales. En relación con las propiedades físicas y químicas de la columna de agua, pueden variar la intensidad de la luz, la temperatura, pH, dureza, y la concentración de oxígeno disuelto (Rand, 1995).

El ciclo vital de las plantas y su capacidad de asimilación de ciertos compuestos presentes en el medio ha sido objeto de investigación en los últimos años para su aplicación al tratamiento de aguas residuales (eliminación de nutrientes, metales, otros contaminantes) (Lavoie y Nolauue, 1985; Tripathi y Shukla, 1991; Metcalf y Eddy, 1991). En este sentido, destacan las tecnologías para el tratamiento de vertidos de baja carga contaminante denominados *filtros verdes* en los que se utilizan plantas del tipo de juncos, espadañas y aneas, y los tratamientos de eliminación de nutrientes en los cuales se utilizan plantas tipo jacintos y lentejas de agua (Reedy, 1987; Tchobanoglous, 1987; Metcalf y Eddy, 1991).

Boyle (1984) y O'Kelley y Deason (1986) determinan en sus estudios que algunas especies de plantas acuáticas son capaces de biodegradar algunos pesticidas, compuestos los cuales son potencialmente tóxicos para estos organismos. Algunas especies de plantas pueden movilizar metales desde los sedimentos provocando por tanto una reducción en la calidad del agua circundante (Laube *et al.*, 1979). Por el contrario, otras especies son capaces de asimilar grandes cantidades de metales pesados siendo éstas muy utilizadas en tratamientos de descontaminación de suelos o fitoremediación. El más claro y cercano ejemplo es la utilización de plantas para la eliminación de metales en zonas afectadas por el incidente de Aznalcollar (CMAA, 2000).

En algunas ocasiones, la presencia de algas puede perturbar negativamente al medio. Por ejemplo, un exceso de crecimiento de algas en zonas costeras puede afectar a los usos recreacionales de las aguas, e incluso algunas de las especies causantes de estos blooms producen toxinas las cuales pueden afectar a otras algas, fauna en general y humanos (Palmer, 1977; Graneli *et al.*, 1990). Otros problemas asociados a un alto crecimiento de plantas acuáticas son corrosiones en metales, problemas de olores, y parasitismo en otras especies acuáticas de peces e invertebrados.

Debido a la importancia ecológica de las plantas tanto de agua dulce como de agua de mar, estos organismos se han utilizado durante muchos años como biomonitores de cambios ambientales. En el caso del fitoplancton, al presentar ciclos de vida tan cortos, pueden responder rápidamente a los cambios ambientales, por tanto, su diversidad y densidad pueden indicar la calidad de su hábitat. Así, la presencia de algunas especies de fitoplancton indican aguas limpias (p.e. *Melosira islandica*, *Cyclotella ocellata*, *Posidonia oceánica*) y otras pueden indicar situaciones de contaminación (p.e. *Ulva lactuca*, *Mycrocystis aeruginosa*, *Aphanizomenon flos-aque*). Las últimas dos especies se han asociado con blooms nocivos y condiciones anóxicas creando malos olores y sabores.

2.3.2. NECESIDAD DE DATOS DE FITOTOXICIDAD

Aunque los ecólogos reconocen la gran importancia que tienen las algas en la estructura de los sistemas acuáticos, esta actitud no ha sido la seguida por los ecotoxicólogos. De forma general se ha extendido el uso de datos de toxicidad de invertebrados y peces considerándolos como mucho más importantes y representativos basándose en que este tipo de organismos son más sensibles a los tóxicos. Sin embargo, muchos estudios de toxicidad demuestran una mayor sensibilidad en las plantas (ECETOC, 1993; Rammamorthy y Baddaloo, 1995; Rand, 1995). Por ejemplo, en estudios de toxicidad realizados para la clasificación de nuevos compuestos químicos, se ha demostrado que el alga verde de agua dulce *Selenastrum capricornotum* fue más sensible o de igual orden de magnitud que otros organismos de ensayo tradicionales como son *Daphnia magna* y diversas especies de peces (Benenati, 1990). Estos patrones de sensibilidad también se ha encontrado en algunos estudios con especies marinas de algas, encontrándose en muchos casos mayores sensibilidades en éstas que en especies animales (Thursby *et al.*, 1993).

En un análisis global puede decirse, que sensibilidad de las plantas y los animales es específica de la especie y del compuesto, y por tanto no es predecible. El concepto de un grupo universal de especies sensibles de ensayo, bien sean animales y/o plantas, no es real y la consideración de que la toxicidad en animales puede servir como sustitutos de los datos de plantas de aguas dulces y marinas no es técnicamente válido sin unos datos que lo afirmen. Consecuentemente, los ensayos de fitotoxicidad son necesarios para evaluar el impacto de contaminantes potenciales que pueden introducirse en el medio ambiente.

Afortunadamente, en los últimos años esto está cambiando. El pasado mes de noviembre se realizó en Madrid una reunión internacional acerca de las "*Tendencias de futuro en la valoración ecotoxicológica mediante microbioensayos*", la cual contó como organismos colaboradores el Ministerio de Medio Ambiente, el CEDEX y el Laboratorio de Toxicología Ambiental y Ecología Acuática de Gante (Bélgica). En esta reunión, se apuntó en varias ocasiones la urgente necesidad de la utilización de ensayos con plantas y fundamentalmente con microalgas, para la evaluación de la toxicidad de sustancias peligrosas y la evaluación ecotoxicológica del medio acuático.

Actualmente, en los Estados Unidos se utilizan los datos de fitotoxicidad para el cálculo de los criterios de calidad de aguas nacionales y de áreas específicas (Stephan *et al.*, 1985; Carlson *et al.*, 1985), clasificación y etiquetado de nuevos compuestos (USEPA, 1985) y el registro de pesticidas (Holst y Ellwanger, 1982), evaluación de la toxicidad de efluentes (Weber *et al.*, 1993; OECD, 1984; EEC, 1987; Freemark *et al.*, 1990; Vasseur *et al.*, 1991), y para evaluar la toxicidad de los productos de biorremediación de derrames petrolíferos (NETAC, 1991). En Europa, el convenio OSPAR para la protección del Atlántico nororiental y la Directiva 60/2000/CE Marco de Aguas son algunos de los ejemplos actuales en relación a la introducción de estos ensayos para la evaluación del riesgo de sustancias peligrosas presentes en los vertidos y en el medio ambiente.

También se ha documentado un incremento en el uso de las algas y las plantas vasculares como monitores de la toxicidad de sedimentos contaminados y lixiviados de vertidos peligrosos (Thomas *et al.*, 1986; Giesy y Hoke, 1989; Cheung *et al.*, 1993; Clement *et al.*, 1996, 1997; Wong, 1999).

A pesar de las aplicaciones mencionadas, en los procesos normativos los datos de toxicidad de algas no ha tenido la importancia dada a los procedentes de invertebrados y peces. Además, basándonos en textos normativos y diversas bases de datos de toxicidad, se ha observado que la especie más usada es el alga verde de agua dulce *Selenastrum capricornotum*. Este hecho debe de cambiar en el futuro en tanto en cuanto se vaya adquiriendo experiencia en estos ensayos y en la sensibilidad de otras especies.

2.3.3. HISTORIA DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO CON ALGAS

La primera vez que se realizaron ensayos de toxicidad con algas fue en 1910 para evaluar la efectividad de alguicidas, sin embargo, hasta mediados de los años 60 no se estableció, validó y publicó el primer método para ensayar la toxicidad con algas. Este método se denominó el *Algal Assay Procedure Bottle Test (AAP)* (USEPA, 1971). Un método parecido para algas marinas se desarrolló poco después para realizar estudios de limitación de nutrientes, potencial de crecimiento de las algas, y productividad algal de aguas naturales (USEPA, 1974). Este ensayo no se diseñó con objeto de evaluar la toxicidad de compuestos químicos y por tanto se limitó su uso en estos estudios. Posteriormente, se realizó una variación del método *AAP* (Miller *et al.*, 1978), el cual ha servido como base de muchos de los actuales métodos publicados por diferentes normativas, organizaciones de normalización de métodos, agencias medioambientales, etc (Tabla C III.2).

Tabla C III.2.
Métodos de ensayo de fitotoxicidad publicados (Rand, 1995, modificada)

| MÉTODO | ALGAS | | REFERENCIA |
|--|--------------|---------------|----------------------------|
| | Aguas dulces | Aguas marinas | |
| Ensayo de algas del procedimiento de botella | ☺ | | USEPA (1971) |
| Ensayos de algas marinas del procedimiento de botella | | ☺ | USEPA (1974) |
| Método para medir la toxicidad de las algas y su aplicación a la evaluación de factores de seguridad de nuevos compuestos químicos | ☺ | ☺ | Payne y Hall (1979) |
| Método de ensayo de algas marinas con pesticidas y efluentes industriales | | ☺ | Walsh y Alexander (1980) |
| Ensayo de inhibición del crecimiento de algas | ☺ | | OECD (1984) |
| Ensayo de toxicidad aguda de algas | ☺ | ☺ | USEPA (1985) |
| Ensayo con algas | ☺ | | FDA (1987) |
| Ensayos para determinar la ecotoxicidad de nuevos productos químicos | ☺ | | EEC (1987) |
| Ensayo de inhibición del crecimiento de algas –Calidad de Aguas- | ☺ | ☺ | ISO (1987; 1988) |
| Guía estándar para realizar ensayos de toxicidad estáticos de 96-h con microalgas | ☺ | ☺ | ASTM (1990) |
| Guía estándar para realizar ensayos de toxicidad crónicos estáticos de 96-h con vertidos de sustancias peligrosas usando el alga de agua dulce, <i>Selenastrum capricornotum</i> | ☺ | | ASTM (1990) |
| Métodos para ensayar los productos para la biorremediación de derrames de petróleo | ☺ | | NETAC (1991) |
| Ensayos de toxicidad con fitoplancton | ☺ | ☺ | APHA <i>et al.</i> (1992) |
| Ensayo de inhibición del crecimiento del alga de agua dulce <i>Selenastrum capricornotum</i> | ☺ | | Environment Canada (1992) |
| Métodos a corto plazo para estimar la toxicidad crónica de efluentes y aguas receptoras con organismos de aguas marinas y estuáricas | | ☺ | Weber <i>et al.</i> (1993) |
| Métodos a corto plazo para estimar la toxicidad crónica de efluentes y aguas receptoras con organismos de agua dulce | ☺ | | Weber <i>et al.</i> (1993) |

2.3.4. DESCRIPCIÓN DE LOS MÉTODOS DE ENSAYO

La mayoría de los ensayos de toxicidad con algas son ensayos crónicos puesto que se evalúan los efectos a lo largo de varias generaciones durante los 3 a 4 días de periodo de exposición.

En general, los tests descritos y citados en el tabla anterior siguen la misma técnica. Se suelen realizar ensayos estáticos para evaluar los efectos de un tóxico sobre el crecimiento exponencial de la población de algas al cabo de 72 a 96-h de exposición en un medio enriquecido en nutrientes. En los ensayos se incluye un blanco o control, y al menos 5 concentraciones de tóxico con un mínimo de un triplicado para cada uno de ellos, generalmente situados sobre un agitador que genere oscilaciones a razón de aproximadamente 100 oscilaciones por minuto. En caso de no disponer de este sistema de agitación, puede sustituirse por una agitación manual realizada una o dos veces al día. Los ensayos se realizan bajo condiciones controladas de temperatura, luz y pH inicial. La biomasa se determina o se estima varias veces a lo largo del test con objeto de obtener información periódica del efecto de los compuestos sobre el crecimiento algal. Algunos de los métodos citados anteriormente con efluentes urbanos e industriales varían la técnica respecto a los ensayos de compuestos específicos.

Los ensayos de toxicidad de microalgas marinas y compuestos específicos son similares a los descritos para microalgas de aguas continentales o aguas dulces, es decir, se realizan ensayos estáticos con especies fáciles de cultivar y de crecimiento rápido. Para algas marinas se han publicado algunos métodos más de los que se resumen en la anterior tabla (Anderson y Hunt, 1988; Blanck y Bjornsater, 1989). También se han desarrollado ensayos de toxicidad de efluentes con macro y microalgas marinas. Para ello, es necesario ajustar la salinidad de los efluentes ya que los vertidos a aguas marinas y estuarinas suelen ser de salinidad muy baja. Los métodos de macroalgas recomendados por Weber (Weber *et al.*, 1993) se diferencian bastante de los propuestos para microalgas. El ensayo con macroalgas consiste en exponer plantas masculinas y femeninas a diferentes diluciones del efluente durante dos días, seguido por un periodo de tiempo de recuperación de unos 5 a 7 días en un medio control para determinar la maduración de los cistocarpios y su comparación con la obtenida para algas control. En estos ensayos, la máxima concentración de efluente que se puede ensayar es el 50% del efluente.

En la siguiente tabla se resumen de forma comparativa las condiciones experimentales de los ensayos más usados con algas.

Tabla C III.3
Comparación de variables recomendadas en algunos ensayos de toxicidad estándar para micro- y macroalgas (Rand, 1995, modificada)

| Variable experimental | ASTM (1990) | Weber <i>et al.</i> (1993) | Weber <i>et al.</i> (1993) | ISO (1987) | USEPA (1985) | OECD (1984) | Holst y Ellwanger (1982) |
|---|---|---|---|---|--|---|--|
| Densidad inicial de células (cél/mL) | 2x10 ⁴ 5x10 ⁴ | 1x10 ⁴ | 5 ramas femeninas y 1 masculina | 1x10 ⁴ | 1x10 ⁴ 7,7x10 ⁴ | 1x10 ⁴ | No definido |
| Duración del ensayo | 4 d | 4 d | 2-d exposición, 5-7-d recuperación | 3 d | 4 d | 3 d | 5 d |
| pH | 7,5-8,0 | 7,5 (± 0,1) | No definido | 8,3 (± 0,2) | 7,5 (± 0,2) 8,0 (± 0,1) | 8,0 | 7,5-8,5 |
| Iluminación (μE m ⁻² s ⁻¹) | 30-90 (± 15) | 86 (± 8,6) | 100 | 120 (± 20%) | 300 (± 25) | 120 (± 20) | 40-85 |
| Temperatura (°C) | 24 (± 2) 20 (± 2) | 25 (± 1) | 23 (± 1) | 23 (± 2) | 20 (± 2) 24 (± 1) | 21-25 (± 2) | 24 (± 2) |
| Cálculos | IC ₅₀ , NOEC | LOEC, NOEC | LOEC, NOEC | EC ₅₀ , NOEC | EC ₀ , EC ₁₀ , EC ₅₀ , EC ₉₀ | EC ₅₀ , NOEC | EC ₁₀ , EC ₅₀ , EC ₉₀ |
| Números de replicados | 3 | 3 | 3-4 | 3 y 6 en controles | 3 | 3 y 6 en controles | 3 |
| Aceptabilidad del test | > 1x10 ⁶ cel/mL después de 96-h en los controles | 2x10 ⁵ cel/mL en el control: >20% de variabilidad e los replicados del control | Las plantas control deben presentar 10 o más cistocarpios | La densidad de células en los controles debe incrementarse en 16x después de 72-h | 3,5x10 ⁶ cel/mL después de 96-h en los controles en ensayos de agua dulce; 1,5x10 ⁶ cel/mL para especies marinas | La densidad de células de los controles debe incrementarse 16x después de 72h | No determinado |

2.3.5. ENSAYO Y MEDIO DE CULTIVO

Las algas se cultivan y exponen a la sustancia de ensayo en un medio enriquecido. En el caso de los ensayos con algas de agua dulce, el medio nutritivo es una disolución de micro- y macro-nutrientes en agua destilada, filtrada o desionizada. Ciertas concentraciones de estos nutrientes se disuelven en el agua de dilución y se ajusta el pH entre 7,5 y 8,5. Este medio se esteriliza por filtración a través de un filtro de 0,22 μm de diámetro de poro o se esteriliza mediante autoclave justo antes de su uso. En los ensayos con efluentes, antes de realizar las diluciones se añade la misma cantidad de nutrientes tanto a la muestra de efluente como al agua de dilución. De esta forma al realizar las diluciones, el contenido nutritivo se mantiene invariable. Los medios nutritivos para el crecimiento de algas marinas pueden ser agua de mar natural o agua de mar sintética preparada a partir de una mezcla de sales, nutrientes esenciales, metales trazas y vitaminas. Existen un gran número de referencias acerca de formulaciones de medios nutritivos y técnicas de cultivo de algas de agua dulce y algas marinas (Guillard y Ryther, 1962; Allen, 1968; Provasoli, 1968; Droop, 1969; Rosowski y Parker, 1971; Stein, 1973; Ukeles, 1976; Bold, 1980; Harrison *et al.*, 1980; Brand, 1984; Walsh, 1988; Parker, 1997; etc.).

La composición del medio nutriente debe ser representativo de las aguas naturales ya que podría afectar al realismo ambiental de la aplicación de los datos de fitotoxicidad. En relación a los componentes habituales en estos medios nutritivos, se han realizado muchos estudios acerca de uno de los compuestos: el ácido etilendiaminatetraacético, más conocido como AEDT (EDTA en abreviatura inglesa). Este compuesto acompleja los metales trazas que se adicionan como nutrientes haciéndolos biodisponibles. Si no se añade un quelante, el crecimiento de las algas puede atenuarse considerablemente. Sin embargo, en el caso de ensayar la toxicidad de metales pesados, la adición o no de AEDT al medio nutriente puede afectar considerablemente los resultados de toxicidad de estos

compuestos. La USEPA no recomienda adicionar AEDT en los ensayos con efluentes (Weber *et al.*, 1993), en ensayos de compuestos específicos (USEPA, 1985) y en ensayos con pesticidas (Holst y Ellwanger, 1982); sin embargo, sí es recomendada en otros tests (OCDE, 1984; ISO, 1987; ASTM, 1990; APHA *et al.* 1992). Además del AEDT, el contenido en nitrógeno y fósforo puede afectar significativamente la toxicidad de compuestos específicos y efluentes, por ello es muy importante definir, al comienzo del ensayo y dependiendo del objetivo de éste, la adición o no de estos u otros compuestos presentes en la formulación del medio nutritivo.

2.3.6. INÓCULO- DENSIDAD INICIAL DE CÉLULAS

Un ensayo de toxicidad con algas comienza cuando el medio de ensayo se inocula con algas en fase exponencial de crecimiento obtenidas de un cultivo de laboratorio. Muchos métodos de ensayo describen las técnicas de cultivo en discontinuo para la obtención de las algas de ensayo. Los cultivos en quimiostatos no se suelen utilizar sin embargo algunos autores las recomiendan (Hall *et al.*, 1989; Peterson, 1991). En muchos procedimientos estandarizados se recomienda un mínimo nivel de inóculo para reducir la posibilidad de una fase retardada y para incrementar la probabilidad de alcanzar crecimientos logarítmicos a los 3-4 días de comienzo del ensayo. Esto es importante ya que uno de los criterios de aceptabilidad del test de toxicidad en muchos métodos es que la población control debe alcanzar una determinada densidad celular a la finalización del ensayo (Tabla C III.3). El inóculo se fabrica 3 o 4 horas antes del comienzo del test a partir de un cultivo de 7 a 10 días de edad en fase exponencial de crecimiento (Rand, 1995).

2.3.7. TEMPERATURA, LUZ Y pH

La temperatura y la luz deben controlarse durante todo el ensayo de toxicidad ya que afectan significativamente al crecimiento de las algas. Las temperaturas recomendadas se encuentran entre los 20 y los 25°C. La intensidad de luz recomendada se encuentra entre los 80 y los 120 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. En algunas especies de agua marina se recomiendan también períodos de 14 horas de luz y 10 horas de oscuridad (Rand, 1995).

El pH inicial es otro factor que debe controlarse tal y como recomiendan los métodos de toxicidad. Puede variar hasta en dos unidades en los ensayos de toxicidad (Nyholm y Kkällqvist, 1989) pudiendo alterar la toxicidad de algunos compuestos y/o elementos tales como los metales (Skowronski *et al.*, 1991).

2.3.8. DURACIÓN DEL TEST

En relación con el periodo de exposición, la bibliografía muestra ensayos de toxicidad de duración comprendidas entre menos de 1 hora y hasta de 3 semanas, pero el periodo de exposición típico en estudios de crecimiento de población es de 3 a 4 días. En aquellos ensayos en los cuales pueda existir una reducción de la concentración de tóxico por procesos de adsorción o biodegradación, se aconseja que se reduzca el tiempo de exposición. También pueden diseñarse ensayos de más de 4 días de duración para determinar los efectos tóxicos de los productos de biodegradación, procesos de estimulación del crecimiento, y determinación de concentraciones algaísticas. Ejemplos de estos ensayos de mayor duración (de 5 a 21 días) se han descrito por Payne y Hall (1979) y por la Administración de Alimentación y Fármacos (FDA, 1987).

2.3.9. ESPECIES DE ENSAYO

En la tabla C III.4. se muestran algunas especies de ensayo recomendadas en diferentes procedimientos de toxicidad. La selección de las algas de ensayo suele hacerse en función de su disponibilidad y fácil cultivo, y en menor grado, por su relevancia ecológica y sensibilidad a los tóxicos. De las especies incluidas en la lista, las más utilizadas son el alga verde de agua dulce *Selenastrum capricornutum* y la diatomea marina *Skeletonema costatum*, posiblemente debido a que son las especies recomendadas en el método AAP (USEPA, 1971a, b; 1974). Walsh y Alexander (1980), Missimer *et al.* (1989), y Cowgill *et al.* (1989) entre otros han evaluado el uso de *Skeletonema costatum*. Esta microalga marina está considerada como una especie "sensible" (Walsh, 1988) siendo incluso más sensible que *Selenastrum capricornutum* para gran número de compuestos (Le Blanc, 1984).

Los ensayos de toxicidad con macroalgas marinas se han realizado con menos frecuencia que con microalgas. El macroalga roja *Champia pàrvula* es la especie que se recomienda para determinar la toxicidad de efluentes vertidos al medio marino (Weber *et al.*, 1993), sin embargo, este alga es típica de aguas costeras tropicales lo que ha provocado que se utilice con más frecuencia otras algas más adecuadas (p.e. *Macrocystis pyrifera*).

Tabla C III.4
Microalgas recomendadas en varios métodos de toxicidad publicados (Rand, 1995, modificado)

| ESPECIES | MÉTODOS |
|------------------------------------|---|
| <u>ALGAS VERDES</u> | |
| Algas de agua dulce: | |
| <i>Selenastrum capricornutum</i> | ASTM (1990); APHA <i>et al.</i> (1992), FDA (1987), ISO (1987); Weber <i>et al.</i> (1993), USEPA (1985), OECD (1984), Holst y Ellwanger (1982), USEPA (1971) |
| <i>Scenedesmus subspicatus</i> | OECD (1984), ISO (1987), ASTM (1990) |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i> | USEPA (1985) |
| <i>Chlorella vulgaris</i> | USEPA (1985), ASTM (1990), OECD (1984), USEPA (1985) |
| Algas marinas: | |
| <i>Dunaliella tertiolecta</i> | APHA <i>et al.</i> (1992); USEPA (1974); ASTM (1990) |
| <u>ALGAS VERDE-AZULADAS</u> | |
| Algas de agua dulce: | |
| <i>Microcystis aeruginosa</i> | ASTM (1990), APHA <i>et al.</i> (1989), Holst y Ellwanger (1982), USEPA (1971) |
| <i>Anabaena flos-aque</i> | ASTM (1990), APHA <i>et al.</i> (1989), Holst y Ellwanger (1982), USEPA (1971) |
| <u>DIATOMEAS</u> | |
| Algas de agua dulce: | |
| <i>Cyclotella spp.</i> | APHA <i>et al.</i> (1992) |
| <i>Navicula pelliculosa</i> | ASTM (1990) |
| <i>Nitzschia sp.</i> | APHA <i>et al.</i> (1992) |
| <i>Synedra sp.</i> | APHA <i>et al.</i> (1992) |
| Algas marinas: | |
| <i>Skeletonema costatum</i> | ASTM (1990); APHA <i>et al.</i> (1989); USEPA (1985); Holst and Ellwanger (1982); USEPA (1974) |
| <i>Thalassiosira pseudonana</i> | ASTM (1990); APHA <i>et al.</i> (1992); USEPA (1985); USEPA (1974) |

(No se incluyen cepas específicas y/o clones)

2.3.10. SENSIBILIDAD DE LAS ESPECIES DE ENSAYO

Una consideración clave en los ensayos de toxicidad con algas es la elección de las especies de ensayo ya que esta decisión puede afectar decisivamente a los resultados del ensayo. La mayoría de los métodos normalizados se han desarrollado con algas verdes de agua dulce. Si bien en estos métodos se recomienda el uso de otras especies, la elección de otras algas de ensayo no es frecuente puesto que pueden presentar

variaciones interespecíficas, pueden existir diferentes clones con diferentes tolerancias a los tóxicos, e incluso pueden existir diferentes razas para diferentes distribuciones geográficas. Por ello, se recomienda la utilización de varias especies seleccionadas en un amplio rango de grupos taxonómicos de forma que se puedan obtener resultados dentro de un amplio abanico de posibilidades (Rand, 1995). Estas baterías de ensayos ya se han recomendado en ensayos de toxicidad con pesticidas (Holst y Ellwanger, 1982). Por supuesto, cada especie debe identificarse y describirse haciéndolo notar en los resultados de toxicidad.

2.3.11. PARÁMETRO DE RESPUESTA

Las algas exhiben distintas respuestas a los tóxicos: inhibición del crecimiento, estimulación del crecimiento, y cambios fisiológicos y morfológicos.

El efecto más estudiado ha sido la inhibición del crecimiento basándose en cambios de la biomasa. Esta biomasa puede determinarse mediante métodos directos o indirectos los cuales vienen descritos con detalle en la bibliografía (APHA *et al.*, 1992). El método directo por excelencia es la determinación de peso seco mediante la técnica de cápsula de aluminio o el de filtro de membrana. Como métodos indirectos se recomiendan varios métodos, y varias técnicas para cada método: recuento de células, mediante contador electrónico de partículas y/o mediante recuento microscópico directo; absorbancia a 750 nm en espectrofotómetro o colorímetro; clorofila mediante fluorimetría (*in vivo*) y/o colorimetría previa extracción con disolvente (*in vitro*); y por último, análisis del carbono celular total mediante un analizador de carbono.

Las medidas totales de células (whole-cell) incluyen cálculo del peso seco y recuento de células. El peso seco es una medida directa pero presenta varios inconvenientes: requiere mucho tiempo; existe la posibilidad de pérdida de células en el proceso; y en el caso de ensayos con microalgas marinas el contenido de sales del medio de ensayo puede interferir en la medida. Existen diversas técnicas microscópicas para el recuento de células pudiéndose observar además otros efectos como cambios morfológicos de las células, color, tamaño, etc. Con esta técnica se realiza el recuento total de células, esto es células vivas y muertas. En el caso de querer medir la viabilidad algal, puede realizarse usando tintes como el Azul de Evans (USEPA, 1985). Pueden utilizarse contadores de partículas con el inconveniente del coste y el calibrado de estos aparatos. En el caso de efluentes no es aconsejable el uso de estos contadores debido a su posible contenido en partículas que puede interferir en la medida. La biomasa puede determinarse también por el seguimiento de constituyentes celulares como la Clorofila *a* mediante el uso de técnicas espectrofotométricas o fluorométricas (ASTM, 1979; APHA *et al.*, 1992). Otras técnicas utilizadas con menos frecuencia estiman la biomasa mediante medidas del ADN y ATP. Por ejemplo, la técnica de microplatos descrita por Blaise *et al.* (1986) está basada en medidas de ATP.

Los efectos fitotóxicos suelen estar basados en cambios en la velocidad de crecimiento. La forma de medir esta velocidad se ha discutido durante mucho tiempo por diversos autores sin llegar aún a un consenso. La OECD (1984), ISO (1987) y ASTM (1990) recomiendan medidas del área bajo la curva de crecimiento como parámetro sensible para ensayos con diferentes compuestos orgánicos.

Las algas crecen rápidamente y pueden recuperarse en un breve periodo de tiempo si solamente están inhibidas pero no muertas. Así pues, en algunos casos es más significativo buscar la concentración alguicida o alguistática en lugar de la EC_{50} , la cual representa una reducción parcial de la curva de crecimiento de la población. Payne y Hall (1979) recomiendan el uso de estos parámetros y estados puesto que argumentan que una reducción del 50% en el crecimiento no es significativo puesto que el crecimiento en cultivos de laboratorio siguen una función logarítmica y por tanto, los resultados son dependientes del tiempo. Hughes *et al.* (1988) concluye que las concentraciones alguistáticas y alguicidas son las que presentan un significado ambiental más real, sin embargo. Si bien existen algunos autores que apoyan el uso de estos niveles de efecto, no se suelen incluir en la literatura científica ni en los documentos normativos.

En relación a la expresión de los resultados de toxicidad de algas, existen diversas respuestas las cuales se representan en la siguiente figura.

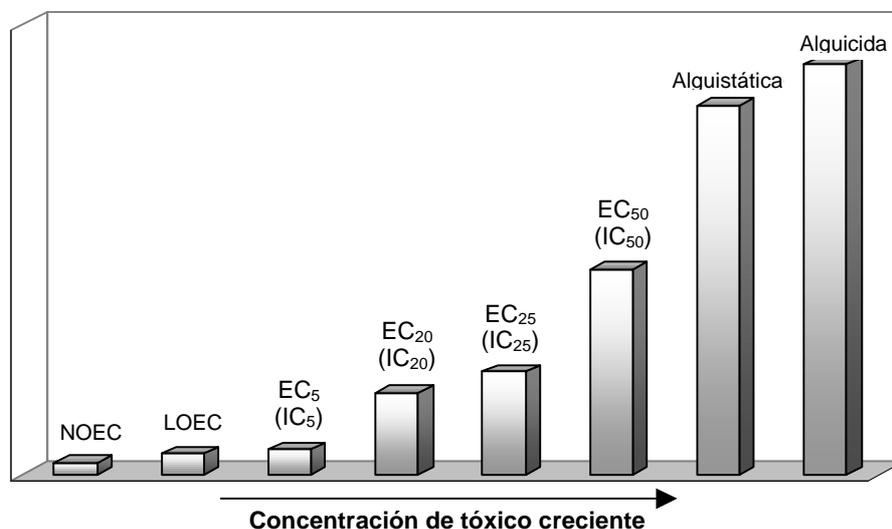


Figura C III.1. Relación entre las diferentes respuestas obtenidas en los ensayos de fitotoxicidad

En la mayoría de los métodos publicados se recomienda el cálculo de la EC₅₀ y NOEC. Los métodos para efluentes descritos por Weber *et al.* (1993) recomiendan la NOEC y la LOEC.

Para la estimación de los valores de NOEC y LOEC el método más utilizado es el método paramétrico de Dunnett. Para poder aplicar este método, es preciso ensayar la normalidad de la distribución de datos y la homogeneidad de la varianza de los replicados. Para ello se usan test de contraste de hipótesis. Mediante interpolación gráfica se puede determinar el grado de inhibición y estimulación de cualquier concentración de ensayo, pero de forma más rigurosa se aconseja el análisis de regresión que proponen algunos autores (Lewis, 1994). La concentración alquistática puede determinarse usando análisis de regresión lineal y "estimación inversa" (Payne y Hall, 1979). En posteriores apartados se realiza una descripción más exhaustiva de algunas de estas técnicas de análisis.

La inhibición en el crecimiento es la respuesta usual de las algas expuestas a compuestos químicos, sin embargo, puede ocurrir una estimulación en el crecimiento como ocurre en ocasiones en ensayos con efluentes (Lewis, 1994; Rand, 1995). La estimulación se ha considerado como un efecto importante en algunos ensayos publicados pero son muy pocos los artículos que describen los pasos para su cálculo e interpretación. La SC₂₀ representa la concentración que incrementa el crecimiento en un 20% en relación con la población control. Puede determinarse mediante interpolación gráfica o mediante el método de media-móvil.

Los cambios fisiológicos no se utilizan generalmente en los ensayos de toxicidad con microalgas, aunque se han hecho estudios relativos a este tema. La relación entre efectos fisiológicos y crecimiento de la población y su relación con la estructura de la comunidad de algas en el medio natural no se han determinado aún con exactitud. Esto hace que los cambios fisiológicos y morfológicos no juegan un papel significativo en evaluaciones de fitotoxicidad.

2.4. INTRODUCCIÓN A LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD CON CRUSTÁCEOS

El organismo de uso más extendido en la realización de ensayos de toxicidad aguda y crónica es sin duda el crustáceo de agua dulce *Daphnia magna* y en menor grado *Daphnia pulex*. Las razones por las que se utilizan las *Daphnias* en los ensayos rutinarios de toxicidad han sido repetidamente argumentadas por diversos autores y organizaciones internacionales (Environment Canada, 1990, 1992; APHA *et al.*, 1992).

- Amplia distribución geográfica en los cuerpos de agua dulce y en un amplio rango de hábitats;
- Son muy importantes en algunas cadenas tróficas y son una importante fuente de alimento de peces;
- Presentan un ciclo de vida relativamente corto y son relativamente fáciles de cultivar en el laboratorio;
- Son muy sensibles a un amplio espectro de tóxicos.

De entre las numerosas especies de crustáceos que se han utilizado en el medio marino para estudios de toxicidad, la *Artemia* parece ser un candidato muy apropiado para el desarrollo de un bioensayo estándar de utilización mundial puesto que su uso está justificado por las mismas razones expuestas anteriormente para las *Daphnias*. Si bien, la literatura científica y los métodos estandarizados consideran otras especies de crustáceos (Tabla C III.1), el crustáceo *Artemia* presenta un interés adicional, su uso en acuicultura marina. El crustáceo *Artemia* es un organismo de gran interés en acuicultura no sólo por su gran valor energético como fuente nutritiva de gran número de especies de interés comercial, sino también por el hecho de que desarrollen *quistes de resistencia* ante condiciones ambientales adversas los cuales son fácilmente descapsulables en laboratorio en condiciones controladas y favorables

Los quistes de *Artemia* presentan tamaños bastante variables según su procedencia geográfica, aunque se les puede asignar un diámetro comprendido entre 200-270 μm (Amat, 1985). Su color varía entre el gris blanquecino y el pardo oscuro. En estado hidratado presenta forma esférica pero en estado deshidratado efectivo, presenta forma semiesférica con un hemisferio invaginado dentro del otro. En el interior del quiste se halla un embrión protegido por la cáscara. La cáscara está formada por tres capas: cutícula embrionaria, corión y capa alveolar. La utilización de ciertas sustancias como hipoclorito que disuelve el corión, ha promovido la elaboración y perfeccionamiento de las actuales técnicas de decapsulación, aumentando las posibilidades del empleo de quistes de *Artemia* en acuicultura.

A pesar de las ventajas que supone el uso de *Artemia* como organismo de ensayo frente a otros organismos, los estudios revelan que no existe uniformidad en la metodología ni un criterio unificado que se use para estudiar las relaciones dosis-respuesta. Vanhaecke *et al.* (1980) estudiaron los parámetros más importantes para el desarrollo de test de toxicidad rutinario para *Artemia*: selección del estadio del ciclo de *Artemia*; determinación de la duración del test; influencia de las condiciones de almacenamiento de los quistes; estudio de la sensibilidad de diferentes cepas geográficas; selección de un tóxico estándar de referencia; y determinación de la exactitud y precisión del ensayo.

2.4.1. SELECCIÓN DEL ESTADIO DE VIDA ÓPTIMO PARA ENSAYOS DE TOXICIDAD

Debido a las diferentes sensibilidades a los tóxicos que presenta la *Artemia* a la hora de realizar ensayos de toxicidad, es muy importante establecer el estadio del ciclo de vida del organismo al cual se le va a realizar el ensayo.

Vanhaecke *et al.* (1980) establece tres categorías -quistes, nauplio y adulto-, las cuales se resumen a continuación.

QUISTES

Los ensayos con quistes serían ensayos de exposición aguda puesto que el tiempo de eclosión no suele ser superior a 24-48 horas.

Las respuestas ensayadas en los procedimientos de toxicidad con quistes se basan en medidas del porcentaje de éstos que no han eclosionado, los que están eclosionando y los nauplios que presentan natación libre.

El problema que presenta este método como ensayo estándar es la variabilidad en la eficiencia de eclosión en *Artemia* de diversas localizaciones geográficas e incluso entre los diferentes lotes de una misma localización. Además existen fuertes condicionantes relativos a las condiciones de almacenamiento de los quistes.

Experimentalmente es preciso fijar exactamente las condiciones de incubación, principalmente la temperatura puesto que afecta a la relación quiste-nauplio.

NAUPLIOS

Para exposiciones agudas, el criterio de ensayo que se utiliza en estudios de nauplios puede variar ampliamente. En muchos casos, el criterio de vida-muerte es el más fácil de detectar; sin embargo, muchos autores utilizan la inmovilización del individuo, la osmorregulación, y el consumo de oxígeno. Existen también estudios de crecimiento larvario en ensayos de toxicidad crónica pero implica el tener que alimentar a los nauplios con cultivos auxiliares de algas.

Los factores más importantes que hay que fijar para estos ensayos son la iluminación, la temperatura y la edad de los nauplios. La iluminación es importante puesto que tienen a aumentar su actividad vital cuando existe iluminación. La temperatura es también un factor a tener en cuenta porque al aumentar la temperatura, aumentan la actividad fisiológica y por tanto, variaciones de temperatura en el ensayo puede producir alteraciones en la toxicidad a los compuestos. Otro factor a tener en cuenta es la edad de los nauplios. Es importante que el ensayo se haga con nauplios de la misma cohorte. Algunos estudios revelan que el estadio *nauplio II* es más sensible que el *I*, con lo cual, el no discriminar uno de ellos puede llevar a fluctuaciones en los resultados de un experimento con relación a otro. También pueden considerarse los estadios *III* al *XI*. Para los ensayos con *nauplio I* conviene controlar con precisión el periodo de eclosión para obtener organismos de menos de 6 horas de vida.

Para la realización de ensayos de toxicidad con estadios tempranos de crustáceos es conveniente no utilizar agentes químicos para la descapsulación. En estos casos, es más conveniente realizar la eclosión en un medio salino bien natural o artificial, y en condiciones óptimas de temperatura y aireación.

ADULTOS

En estos estudios los criterios que han tomado algunos autores en la relación dosis-respuesta son los siguientes: muerte del organismo, fecundidad, capacidad de reproducción, supervivencia de cigotos y bioacumulación de tóxicos.

Los adultos de *Artemia*, sin embargo, han sido menos usados que los nauplios en estudios de toxicidad aguda puesto que el uso de éstos implica el cultivo y mantenimiento de los organismos.

En ensayos de toxicidad crónica, además se suma al procedimiento el cultivo de microalgas sanas y la alimentación de los organismos durante el transcurso del test, lo cual puede implicar variaciones en los resultados de toxicidad producidos por interacciones entre la alimentación (algas) y los tóxicos.

2.4.2. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO

En concreto para el crustáceo *Artemia*, no existe un procedimiento normalizado que describa las condiciones experimentales, material de ensayo, técnicas de análisis de resultados, etc. Para otros crustáceos de dimensiones similares, sí se han descrito procedimientos de toxicidad (Tabla C III.1) los cuales son aplicables al caso de *Artemia*. Por ejemplo, en APHA *et al.* (1992) los procedimientos descritos para *Daphnia* y *Acartia tonsa* son aplicables a *Artemia*. La única variación sería el procedimiento de eclosión, y el agua de dilución sobre todo en relación con *Daphnia*.

Básicamente estos métodos se basan en tomar un número exacto de individuos y colocarlos en una placa Petri junto con la disolución de ensayo. Al cabo de un tiempo de exposición, se observan los organismos y se anota el número de individuos que presentan la respuesta de efecto. En el caso de realizar ensayos de mortalidad, se observan los individuos que han muerto. Con los porcentajes de supervivientes de las concentraciones de tóxico y de los controles se aplican diferentes técnicas de análisis de datos para obtener los efectos umbrales (Contraste de hipótesis y test de Dunnett; Weber, 1993; Lewis *et al.*, 1994; Rand, 1995) o diferentes LCp (interpolación gráfica, método Probit; método Spearman-Kärber; APHA *et al.*, 1992; Weber, 1993; Lewis *et al.*, 1994; Rand, 1995).

2.5. INTRODUCCIÓN A LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD CON BACTERIAS MARINAS

El ensayo de inhibición de la luminiscencia fue inicialmente comercializado en América del Norte al principio de la década de los 80. Desde entonces se han publicado numerosos artículos científicos que presentan y discuten sus aplicaciones, comparando los resultados obtenidos con este ensayo y los obtenidos utilizando otros ensayos de toxicidad acuática. Soomi *et al.* (1990) y Kramer y Botterweg (1991) determinan que los ensayos con bacterias son los más reproducibles, sensibles, simples, económicos y rápidos para la evaluación de la toxicidad del agua. Por otro lado, Kaisery Palabrica (1991) determinan muy buenas correlaciones entre la toxicidad observada en diversos invertebrados y peces, y las obtenidas mediante el ensayo de bacterias luminiscentes. El test de bioluminiscencia con *Vibrio fischeri* (sistemas MICROTOX y LUMISTOX) se han utilizado en los últimos años para determinar la toxicidad global de diferentes tipos de muestras: efluentes y residuos urbanos e industriales (Vasseur *et al.*, 1986; Morel *et al.*, 1986; Ribo y Kaiser, 1987; Somasundaram *et al.*, 1990; Marañón, *et al.*, 1997; Coya Fernández, 2002), aguas superficiales (Joret *et al.*, 1986; Vasseur *et al.*, 1986; Morel *et al.*, 1988; Fernández *et al.*, 1995); aguas de infiltración (Symons y Sims, 1988), lixiviados (Abassi *et al.*, 1988; Symons y Sims, 1988; Vasseur *et al.*, 1986), y aguas costeras destinadas a diferentes usos (Lau-Wong, 1990; Schiewe *et al.*, 1985).

El ensayo de inhibición de la luminiscencia ha sido estandarizado mediante el uso de un test concreto (DIN/EN/ISO; DIN 38412 L34). Este test ha sido diseñado con el objeto de eliminar los altos costos y el dilatado tiempo que se necesita para la ejecución de otros bioensayos convencionales. Así, mientras que estos últimos necesitan periodos de exposición de 24 a 96 horas para determinar la tasa de mortalidad y la inhibición en el crecimiento de la población o cualquier otra respuesta, el procedimiento realizado con bacterias luminiscentes realiza el análisis en un corto periodo de tiempo generalmente de 15 a 30 minutos.

El tiempo de exposición no es la única ventaja que presentan estos ensayos respecto a otros ensayos de toxicidad tradicionales. Los sistemas LUMISTOX o MICROTOX son relativamente baratos si los comparamos con el coste que supone el mantenimiento de un laboratorio de ensayo y los cultivos de cualquier tipo de organismo acuático. Otra de las ventajas que presenta es el pequeño volumen de muestra que necesita incluyendo replicados, lo cual es idóneo en el caso de que no se disponga de mucho volumen de muestra. Por último, las bacterias se conservan liofilizadas y a -4°C , por tanto, están disponibles durante todo el año.

Para este ensayo, tradicionalmente el valor que expresa la toxicidad de una muestra es normalmente la concentración de muestra que reduce la emisión de luz al 50%. Se habla pues, de EC_{50} o "concentración efectiva que reduce la luminiscencia al 50%". Sin embargo, y dependiendo del estudio que queramos realizar y el tipo de muestra a ensayar se podrán obtener otras respuestas. Por ejemplo, para muestras de toxicidad muy baja, la respuesta a considerar puede ser la EC_{10} o para muestras de alta toxicidad puede utilizarse la EC_{90} .

2.5.1. FUNDAMENTO TEÓRICO DEL ENSAYO DE BACTERIAS LUMINISCENTES

El ensayo de toxicidad LUMISTOX utiliza bacterias marinas luminiscentes, Gram-negativas, no patógenas de la especie *Photobacterium phosphoreum* reclasificada como *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177), como organismo de ensayo para determinar la toxicidad de una muestra acuosa (Gazella, 1995; Lange, 2000). Estas bacterias emiten bioluminiscencia como consecuencia de su metabolismo.

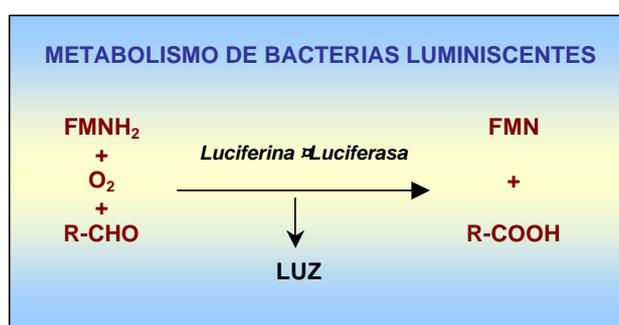


Figura C III.2. Mecanismo de generación de luminiscencia en bacterias

Cualquier muestra que presente toxicidad suficiente afectará a la luminiscencia emitida, ya que se producirán fenómenos de inhibición enzimática del enzima luciferina, reduciéndose la emisión de luz. Para determinar la toxicidad de la muestra, se utiliza la relación de proporcionalidad que existe entre el grado de toxicidad y la respuesta biológica evidenciada, esto es, la disminución de luminiscencia. De esta forma, el efecto tóxico de una muestra se expresará el valor CE_{50} como la concentración efectiva de muestra que causa una reducción del 50% en la luz emitida.

2.6. ENSAYOS DE TOXICIDAD DE AGUAS RECEPTORAS

En el *Capítulo II* de la presente memoria se ha evaluado la calidad de las aguas de cuatro áreas ambientales del Golfo de Cádiz. El problema de esta evaluación y en general con todas las evaluaciones realizadas a partir de los programas de seguimientos ambiental, es que deben limitarse a un cierto número de parámetros. Este número es variable y está condicionado por las posibilidades del laboratorio que realiza el análisis, pero fundamentalmente por el coste que conllevaría la medida del gran espectro de compuestos que pueden encontrarse en las aguas receptoras, y más aún, cuando estamos monitorizando una zona ambiental en la que confluyen los vertidos industriales, vertidos urbanos, escorrentías agrícolas, etc.

Con objeto de hacer una evaluación global de la calidad de una muestra ambiental "compleja", la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (USEPA) diseñó varios procedimientos de ensayo con organismos acuáticos al objeto de evaluar la toxicidad aguda y crónica de estas muestras:

ENSAYOS DE TOXICIDAD AGUDA CON EFLUENTES Y AGUAS RECEPTORAS (Weber, 1993)

Organismos acuáticos de aguas continentales:

- i) *Ceriodaphnia dubia* (crustáceo)
- ii) *Daphnia pulex* y *D. magna* (crustáceo)
- iii) *Pimephales promelas* (peces)
- iv) *Oncorhynchus mykiss* y *Salvelinus fontinalis* (peces)

Organismos acuáticos de estuario o marinos:

- v) *Mysidopsis bahia* (crustáceos)
- vi) *Cyprinodon variegatus* (peces)
- vii) *Menidia beryllina*, *M. menidia*, y *M. peninsulæ* (peces)

ENSAYOS DE TOXICIDAD CRÓNICA CON EFLUENTES Y AGUAS RECEPTORAS

Organismos acuáticos de aguas continentales (Klemm *et al.*, 1994):

- a) *Pimephales promelas* (peces)
- b) *Ceriodaphnia dubia* (crustáceo)
- c) *Selenastrum capricornutum* (microalga)

Organismos acuáticos de estuario o marinos (Lewis *et al.*, 1994):

- d) *Cyprinodon variegates* (peces)
- e) *Menidia beryllina* (peces)
- f) *Mysidopsis bahia* (peces)
- g) *Arbacia punctulata* (equinodermo, erizo)
- h) *Champia párvula* (macroalga)

En relación con los ensayos de toxicidad con especies de estuario o marinas, actualmente la literatura científica se centra básicamente en los estudios con peces, sin embargo cada vez son más los trabajos publicados que utilizan el ensayo de fertilización de erizos para evaluar la calidad ambiental de los sistemas acuáticos. El macroalga *Champia párvula* también se ha utilizado en los últimos años para evaluar la toxicidad de muestras ambientales.

En relación con los organismos de ensayo seleccionados en el presente trabajo (microalgas marinas, *Artemia* y *Vibrio fischeri*) no son muchos los trabajos publicados que describen los procedimientos y resultados obtenidos para la obtención de la toxicidad de muestras ambientales. De ellos, el ensayo de

inhibición de la luminiscencia con *Vibrio fischeri* es el que presenta mayor número de trabajos, posiblemente por las ventajas que proporciona frente a otros ensayos en relación con la rapidez de ejecución, versatilidad, disponibilidad, y bajo coste relativo (Soomi *et al.*, 1990; Kramer y Botterweg, 1991) (algunas de estas referencias se muestran en el apartado 2.3.3.)

En unos estudios previos a la presente memoria realizados para la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía, y relativos a la evaluación de la toxicidad global de muestras ambientales procedentes del litoral de Huelva y Cádiz (aguas y sedimentos), se determinó que los ensayos realizados con *Artemia* y con las bacterias marinas, no proporcionaron una información clara e interpretable de las respuestas de los organismos a las muestras ambientales. En la mayoría de los casos, no se detectó toxicidad, e incluso en todas las muestras, se observó una supervivencia en crustáceos superior al control. En relación con las fotobacterias, también se obtuvieron resultados de luminiscencia superiores a los controles, y en los casos en los que se determinó inhibición, la tendencia espacial de los resultados no presentó la misma lógica que los resultados físico-químicos obtenidos (CMA-Junta Andalucía (documento interno), 2000; Garrido *et al.*, 2000).

En este mismo estudio se ensayó la toxicidad de las muestras ambientales sobre microalgas marinas. El procedimiento que se diseñó y ensayó estuvo basado en el procedimiento para ensayar la toxicidad de aguas receptoras y efluentes con el alga de agua dulce *Selenastrum capricornotum*, con la modificación del medio sintético para los controles el cual fue agua de mar sintética según la formulación propuesta por la USEPA (tabla C III.5.), y el medio nutritivo añadido a los controles y las muestras ambientales el cual fue medio nutriente f/2 (tabla C III.6.) (Garrido *et al.*, 2000).

El ensayo de toxicidad o crecimiento microalgal con el alga de agua dulce *Selenastrum capricornotum* se diseñó, aplicó y validó en el Programa Nacional de Investigación de la Eutrofización y posteriormente fue modificado para realizar el seguimiento ambiental de las aguas receptoras, aguas residuales industriales, municipales y aguas procedentes de fuentes agrarias puntuales y difusas (Lewis *et al.*, 1994).

Los primeros resultados obtenidos en los ensayos de microalgas y muestras ambientales se expresaron en términos de porcentaje de inhibición o sobrecrecimiento respecto a un control constituido por las microalgas de ensayo expuestas a un medio marino artificial abonado con nutrientes (Garrido *et al.*, 2000; Rodríguez *et al.*, 2001). Las conclusiones obtenidas fueron aproximadamente las mismas que las observadas en el ensayo de bacterias luminiscentes sin encontrar un patrón espacial que permitiera identificar las fuentes de contaminación. Para el caso de las microalgas, la conclusión es que la adición de un medio nutritivo afecta a los resultados de toxicidad. Estas mismas conclusiones han sido obtenidas por otros autores (Smith *et al.*, 1987; Walsh *et al.*, 1987; Millington *et al.*, 1988; Fernández *et al.*, 1991)

Partiendo de la base de que con los otros ensayos no se determinó toxicidad en las muestras ambientales, se rediseñaron los ensayos con microalgas al objeto de retomar el objetivo inicial para el cual se diseñó el ensayo con *Selenastrum*, esto es, estudiar el potencial de eutrofización de las aguas receptoras.

Para la evaluación de cada muestra ambiental se realizaron dos ensayos paralelos: (I) un ensayo de crecimiento del alga expuesto a la muestra ambiental (lo que se denominó ensayo sin aporte adicional de nutrientes o ensayo en condiciones naturales o reales), y (II) un ensayo de crecimiento algal en condiciones no limitantes de nutrientes (lo que se denominó ensayo con aporte adicional de nutrientes o ensayos con adición de medio nutritivo f/2). A partir de los resultados obtenidos en ambos ensayos, se definió un nuevo índice –Índice de Eutrofización– cuya definición, evaluación y resultados preliminares ha sido expuesto en varios congresos internacionales (Garrido *et al.*, 2001; 2002).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

En el apartado anterior se han comentado algunas de las pautas generales que se utilizan en los ensayos de toxicidad con algas, crustáceos y bacterias luminiscentes. En este apartado se incluyen toda la información, material, y procedimientos de ensayo y cálculo que se han utilizado en la ejecución de los ensayos.

3.1. PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO CON MICROALGAS MARINAS

Para establecer unos procedimientos adecuados al objeto de ensayar la toxicidad de compuestos específicos, y aguas receptoras y vertidos con microalgas marinas, así como para establecer un correcto análisis de los resultados de los ensayos, se ha consultado principalmente las siguientes fuentes bibliográficas:

Documentos de la USEPA:

- 📖 Weber (1993). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA/600/4-90/027F.
- 📖 Lewis et al. (1994). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms EPA/600/4-91/002.
- 📖 OPPTS (1996). Serie 850. Ecological Effects Test Guidelines. 850-5400: Algal toxicity, Tiers I and II. EPA/712/C-96/164.
- 📖 Quality Assurance Division (1998). Guidance for Data Quality Assessment. Practical Methods for Data Analysis. EPA/600/R-96/084.

Documentos de la OCDE (Organisation for Economic Co-operation and Development):

- 📖 OECD (1998). Series on testing and assessment. Number 10. Report of the OECD Workshop on Statistical Analysis of Aquatic Toxicity Data. ENV/MC/CHEM(98)18

Documentos de APHA-AWWA-WPCF (American Public Health Association; American Water Works Association; Water Pollution Control Federation):

- 📖 APHA *et al.* (1992). Métodos Normalizados. Procedimientos de prueba para algas. Parte 8111: Bioestimulación (productividad algal); Parte 8112: Pruebas de toxicidad en fitoplancton.

Otras referencias bibliográficas:

- 📖 Rand, G.M (ed.) (1995). Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment. Second Edition. Ed. Taylor & Francis, Washington.
- 📖 Kooijman et al. (1996). No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. Water Research, Vol. 30, n° 7.
- 📖 Kooijman et al. (1996). Some statistical properties of estimates of no-effect concentrations. Water Research, Vol. 30, n° 7.

De la evaluación y el análisis de estos procedimientos, se diseñaron los procedimientos de toxicidad que se resumen a continuación.

3.1.1 PRINCIPIOS GENERALES

El procedimiento general de estos ensayos consiste en llenar viales de cultivo con volúmenes apropiados de medio receptor y/o disoluciones del compuesto a ensayar. Al comienzo del ensayo se adiciona un inóculo de las algas a los viales de ensayo y se mantienen bajo unas condiciones de incubación estables y predeterminadas (luz, agitación, temperatura, nutrientes, etc.). Al cabo de 24, 48, 72 y 96 horas se determina la concentración de algas en los viales para comprobar si ha tenido lugar una inhibición o estimulación del crecimiento con respecto al comportamiento observado en los viales control. Con estos datos se define una curva de concentración-respuesta para los diferentes periodos de exposición, y a partir de ellas se calcula la toxicidad, por ejemplo como EC₅₀. Los diseños experimentales deben incluir un número suficiente de réplicas con el fin de permitir una evaluación estadística completa de los resultados.

3.1.2. ALGAS UTILIZADAS

Todas las especies microalgales utilizadas en los diferentes ensayos incluidos en esta memoria, se encuentran en la Colección de Cepas de Microalgas del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC) (Lubian y Yúfera, 1989). Los cultivos utilizados son unialgales pero no axénicos, si bien en estudios realizados anteriormente por González del Valle (1994) se caracterizaron estas poblaciones bacterianas determinándose que no superaban el 3% de la biomasa de las microalgas.

Para la selección de las especies de ensayo se han seguido tres criterios fundamentales:

- Criterios bibliográficos: algas recomendadas en protocolos normalizados, especies de gran frecuencia de aparición en artículos de investigación, trabajos de investigación (Moreno Garrido, 1997; González del Valle, 1997; Perales, 2001).
- Criterios ecológicos: variedad de especies microalgales (pertenencia a diferentes clases), algas más sensibles y menos sensibles; presencia de estas especies en las aguas litorales de estudio.
- Criterios prácticos: disponibilidad de las especies.

Un función de estos criterios se seleccionaron seis especies de microalgas marinas. Las algas *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Dunaliella salina*, *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis chuii* se utilizaron en los ensayos de toxicidad de compuestos químicos. Las algas *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis chuii*, y *Thalassiosira pseudonana* se utilizaron en los ensayos de aguas receptoras. Moreno Garrido (1997) y González del Valle (1997) incluyen en sus tesis doctorales una completa descripción de muchas de estas algas.

Las fotografías muestran la las algas seleccionadas para los ensayos. Estas fotografías, así como los datos que se aportan en la tabla han sido tomados de diversas fuentes bibliográficas (institutos de investigación, diversas colecciones de microalgas, centros educativos, etc.). (Las algas en las diferentes fotografías, no presentan la misma escala).

ALGAS SELECCIONADAS PARA LA REALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD

| <i>Especie</i> | <i>Cepa</i> | <i>Clase</i> | <i>Usos asociados a estas microalgas</i> |
|---------------------------------|--------------|--------------------------|---|
| <i>Dunaliella salina</i> | Duna | <i>Chlorophyceae</i> | Especie halotolerante, capaz de soportar concentraciones saturantes de cloruro sódico. En condiciones hipersalinas, produce gran cantidad de glicerol, hecho que puede ser aprovechado industrialmente. También posee aplicación industrial su capacidad para producir grandes cantidades de β -caroteno. |
| <i>Chaetoceros gracilis</i> | C. grac | <i>Bacillariophyceae</i> | El género <i>Chaetoceros</i> es muy usado en acuicultura como alimento de larvas, postlarvas de moluscos bivalvos, larvas de crustáceos penaeidos y de <i>Artemia salina</i> en cualquiera de sus fases de crecimiento (Pauw y Persoone, 1988; Yúfera y Lubián, 1990). |
| <i>Nannochloropsis gaditana</i> | B-3 | <i>Eustigmatophyceae</i> | De uso generalizado en acuicultura marina, como alimento del rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> (Yúfera y Lubián, 1990). |
| <i>Isochrysis aff. galbana</i> | T-Iso | <i>Haptophyceae</i> | Esta cepa es muy utilizada como alimento para larvas de penaeidos, larvas y postlarvas de bivalvos, y para alimentar a crustáceos como <i>Artemia salina</i> (de Pauw y Persoone, 1988; Lubian y Yúfera, 1989; Yúfera y Lubián, 1990). |
| <i>Tetraselmis chuii</i> | T. chuii | <i>Prasinophyceae</i> | Se ha usado frecuentemente en acuicultura como alimento de larvas de crustáceos penaeidos, larvas y postlarvas de moluscos bivalvos, rotíferos y <i>Artemia salina</i> (Pauw y Persoone, 1988). |
| <i>Thalassiosira pseudonana</i> | Th. pse. Mex | <i>Bacillariophyceae</i> | Se ha usado frecuentemente en acuicultura como alimento de larvas de crustáceos penaeidos, larvas y postlarvas de moluscos bivalvos, rotíferos y <i>Artemia salina</i> |

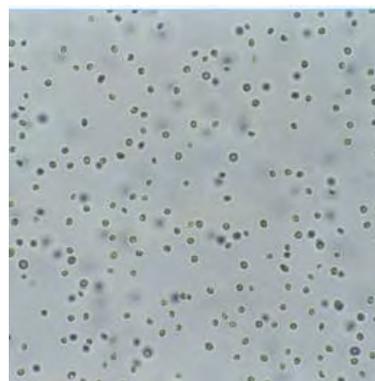


Figura CIII.3 *Bacillariophyceae*
Chaetoceros gracilis (izda.) y *Thalassiosira pseudonana* (drcha.)

Figura C III.4. *Eustigmatophyceae*
-*Nannochloropsis gaditana*-

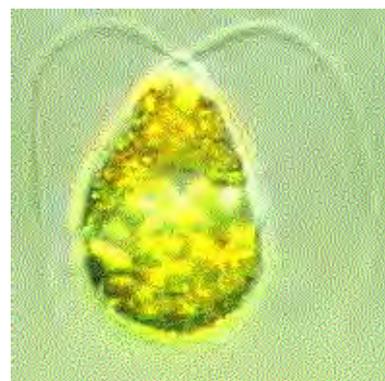


Figura C III.5. *Haptophyceae*
-*Isochrysis galbana*-

Figura C III.6. *Prasinophyceae*
-*Tetraselmis chuii*-

Figura C III.7. *Chlorophyceae*
-*Dunaliella salina*-

3.1.3. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

3.1.3.1. MATERIAL Y EQUIPOS

3.1.3.1.1. INCUBADORA

La incubadora empleada para la realización de los experimentos ha sido una incubadora de precisión Hot-Cold GL 4000700 de la casa comercial J. P. Selecta S. A. de 350 L de capacidad con doble regulación y registro en continuo de temperatura desde 0°C hasta 60°C. Entre otras características cabe destacar un programador horario de ciclo térmico, un programador horario de ciclo de iluminación y un dispositivo de paro automático de iluminación a la apertura de puerta. La iluminación es de 11000 lux mediante 6 lámparas de alta intensidad y un ventilador de refrigeración de la luminaria.

3.1.3.1.2. RECIPIENTES DE CULTIVO

Para el cultivo de las microalgas se emplearon matraces erlenmeyer de borosilicato de 250 mL para un volumen de cultivo de 60-100 mL. Esta relación *volumen del matraz:volumen de cultivo* es adecuada para permitir el intercambio de gases entre el cultivo y la atmósfera (APHA, 1989).

3.1.3.1.3. RECIPIENTES DE ENSAYO

Los ensayos se realizaron en tubos de vidrio borosilicatado esterizables en autoclave, transparentes de 15 mL de capacidad, fondo redondo, longitud de 100 mm y un diámetro de 15 mm (Scharlab, S. L., Prod nº 2613015). Para permitir el intercambio de gases y evitar la contaminación, el cierre de estos tubos de ensayo consistió en cápsulas de aluminio tipo Sero-tap para tubos de diámetro entre 15 y 16 mm (J. P. Selecta S. A., Prod nº 1015162).

3.1.3.1.4. MONOCULTIVOS

Los monocultivos empleados en los ensayos de toxicidad provenían de la Colección de Cultivos de Microalgas Marinas del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía perteneciente al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (ICMAN-CSIC) y fueron suministradas por el Prof. D. Luis Lubián Chaichio. Esta colección está actualmente incluida en el BioCISE (Resource Identification for a Biological Information Service in Europe). Las cepas se encontraban originariamente en tubos estériles con 6 mL de agua de mar natural filtrada y esterilizada, enriquecida con medio nutriente f/2 (Guillard y Ryther, 1962) y un suplemento de silicatos para los cultivos de diatomeas. Estos inóculos fueron sembrados en 100 mL de medio nutritivo esterilizado y se incubaron a 20 ± 1 °C e iluminación continua con luz fluorescente blanca fría a 11000 lux. Este cultivo madre se renovó semanalmente con objeto de tener un suministro continuo de células "sanas" (cultivo de reserva). Asimismo, semanalmente los cultivos fueron examinados al microscopio para asegurar que los cultivos de reserva seguían conteniendo una única especie de microalgas.

3.1.3.1.5. AGUA DE MAR

El agua de mar utilizada tanto para el cultivo como para la preparación de las disoluciones de ensayo (en ensayos con compuestos químicos específicos) y en los viales control de los ensayos, fue un agua de mar sintética para cuya preparación se siguieron las recomendaciones dadas por la USEPA (USEPA, 1990). En la siguiente tabla se recoge la composición del agua de mar utilizada.

Tabla C III.5.
Composición del agua de mar sintética (Weber, 1993)

| Compuesto | Concentración (g/L) |
|---|---------------------|
| NaCl | 21,030 |
| Na ₂ SO ₄ · 10 H ₂ O | 3,520 |
| KCl | 0,610 |
| KBr | 0,088 |
| Na ₂ B ₄ O ₇ · 10 H ₂ O | 0,034 |
| MgCl ₂ · 6 H ₂ O | 9,500 |
| CaCl ₂ · 2 H ₂ O | 1,320 |
| SrCl ₂ · 6 H ₂ O | 0,020 |
| NaHCO ₃ | 0,170 |
| La salinidad es de 30,89 | |

Anexo XIV. Calidad de los reactivos químicos

Una vez preparada, el agua de mar fue filtrada por una membrana de ésteres mezclados de celulosa de 47 mm de diámetro y 0,22 µm de tamaño de poro (Millipore Ibérica, S. A., Prod. nº GSWP04700), y esterilizada mediante un autoclave a una presión de 1 Kg/cm² y a una temperatura de 121 °C durante 10 minutos.

3.1.3.1.6. SOLUCIÓN NUTRIENTE

El medio nutriente empleado fue una modificación del denominado medio f/2 de Guillard y Ryther (1962). Para cada componente de este medio nutriente se preparó una solución stock utilizando agua Milli-Q Millipore® como agua de dilución. Momentos antes de la siembra y/o ensayo se fabricó el medio nutritivo completo y se procedió a abonar el agua de mar sintética y/o las disoluciones de ensayo.

Tabla C III.6.
Composición del medio nutriente, modificado del f/2, empleado en los ensayos de toxicidad con microalgas

| Compuesto | f/2 g/L | Medio Nutritivo mg/litro | Elemento | Medio Nutritivo mg/L |
|--|------------|-----------------------------|----------|-------------------------|
| <i>Macronutrientes</i> | | | | |
| NaNO ₃ | 150,0 | 150,0 | N | 24,724 |
| NaPO ₄ H ₂ · 2H ₂ O | 10,0 | 10,0 | P | 1,985 |
| FeCl ₃ · 6H ₂ O | 3,15 | 3,15 | Fe | 0,651 |
| Na ₂ O ₃ Si | 0,5 | 0,5 | Si (*) | 0,121 |
| <i>Metales traza</i> | | | | |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 0,010 | 0,010 | Cu | 0,003 |
| ZnSO ₄ · 7H ₂ O | 0,022 | 0,022 | Zn | 0,005 |
| CoCl ₂ · 6H ₂ O | 0,010 | 0,010 | Co | 0,002 |
| MnCl ₂ · 4H ₂ O | 0,180 | 0,180 | Mn | 0,050 |
| Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O | 0,006 | 0,006 | Mo | 0,002 |
| <i>Vitaminas</i> | | | | |
| Vitamina B ₁ | 0,100 | 0,100 | | |
| Vitamina B ₁₂ | 0,005 | 0,005 | | |
| <i>Otros componentes</i> | | | | |
| EDTA-Na ₂ · 2H ₂ O | 4,36 | 4,36 | (**) | |

Anexo XIV. Calidad de los reactivos químicos

(*) No incluido en la composición inicial de f/2. Sólo necesario para diatomeas

(**) Suprimir este compuesto en ensayos con metales

3.1.3.1.7. INÓCULOS DE ENSAYO

A la hora de preparar y adicionar el inóculo hay que tener en cuenta que en los ensayos de inhibición del crecimiento de microalgas es muy importante la cantidad y calidad del inóculo añadido a cada tratamiento. Según las recomendaciones consultadas en los diferentes procedimientos de toxicidad, debe añadirse un inóculo de tal forma que la biomasa inicial de los tratamientos del ensayo se correspondan con la fase inicial de crecimiento exponencial de la población. Teniendo esto en cuenta, el uso de una concentración inicial de microalgas demasiado baja puede dar lugar a la aparición de períodos de latencia que invalidarían el ensayo. Dado que la concentración inicial de biomasa límite va a depender del tipo de especie, fue necesario realizar un ensayo preliminar para determinar cual es la concentración inicial de microalgas óptima para cada especie. La descripción del ensayo así como los resultados obtenidos se resumen en el apartado 3.1.3.2.1.2. del presente capítulo.

De forma resumida se puede decir que a efectos prácticos se considerarán inóculos adecuados aquellos que muestren una turbidez inicial entre 0,200 y 0,300 (valores de absorbancia a $\lambda=690$ nm). En el caso de *Thalassiosira pseudonana* este rango será inferior

3.1.3.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD. PREPARACIÓN, MEDIDAS DEL CRECIMIENTO Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

Dependiendo del tipo de ensayo llevado a cabo, la preparación, medidas del crecimiento y análisis de los resultados del ensayo variaron en algunos aspectos. En los siguientes apartados se describe la preparación de los ensayos de forma general para:

- I. **Ensayos de toxicidad de compuestos específicos**
- II. **Ensayos de medio receptor**

Para aquellos ensayos en los que ha habido que hacer alguna modificación del procedimiento general se ha construido una tabla de comentarios en los cuales se muestra la modificación.

La descripción y resultados obtenidos en ambos tipos de ensayos se resume en los apartados 2 y 3 del presente capítulo

3.1.3.2.1. PREENSAYOS DE CALIBRACIÓN

Antes de diseñar los protocolos de ensayo con microalgas marinas fue necesario realizar unos ensayos previos de calibración al objeto de seleccionar:

- Parámetro de medida de biomasa
- Inóculo óptimo de ensayo

3.1.3.2.1.1. Correlación de diferentes medidas de biomasa algal

La evolución de la biomasa algal a lo largo de los días de ensayo puede realizarse mediante diferentes métodos: recuento de células, medidas de pigmentos fotosintéticos, turbidez, peso seco, etc.

Para seleccionar aquella medida más adecuada para los estudios de toxicidad que se quieren llevar a cabo, se realizaron diversas experiencias con el objeto de estudiar la viabilidad de las diferentes medidas.

Las medidas utilizadas en estos ensayos de calibración fueron:

- a. Peso seco
- b. Número de células mediante recuento directo con microscopio y cámara Neubauer de 0,1 mm de profundidad.
- c. Turbidez
- d. Clorofila

Mediante experiencias previas a las que se muestran a continuación se comprobó que con el volumen máximo de muestra de ensayo (4 mL) la medida de peso seco no es adecuada para la medida de la biomasa por lo que se descartó desde el principio.

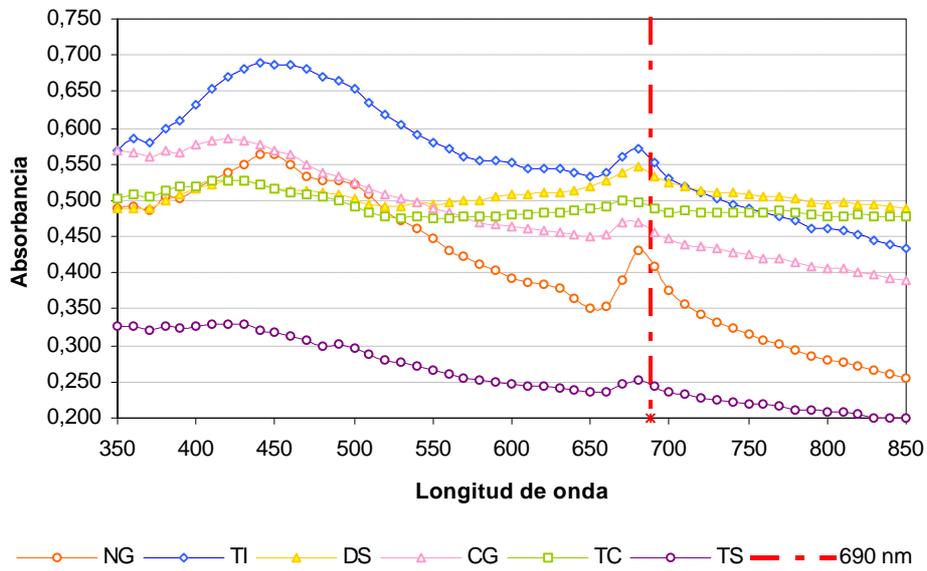
Para la calibración de las tres medidas, se tomaron cultivos de entre 7 y 10 días de edad y se realizaron diluciones seriadas por duplicado, utilizando como agua de dilución, agua de mar sintética. Éstas se realizaron en los mismos tubos que se utilizarían en los ensayos. Para cada dilución se realizó el siguiente procedimiento:

- I. En un espectrofotómetro de barrido se realizó el espectro de absorbancia del cultivo de 7-10 días.
- II. Medidas de la turbidez de la muestra en colorímetro con filtro de 690 nm y adaptador de tubo de 16 mm circular. Cada tubo se midió 4 veces rotando 90° cada vez el tubo con objeto de minimizar posibles imperfecciones en el cristal que generase una distorsión en el haz de luz. La selección de esta longitud de onda se explica posteriormente en el apartado de conclusiones de estos preensayos.
- III. De cada tubo, se tomó 0,5 mL de muestra y se introdujo en viales Eppendorf junto con 0,5 mL de formaldehído al 3,5% para fijar la muestra. Se procedió al recuento de células en cada vial.
- IV. De cada tubo, se filtró 6 mL de muestra a través de un filtro de fibra de vidrio de 0,45 μm de diámetro medio de poro. Posteriormente, se realizó la extracción de los pigmentos fotosintéticos de las células retenidas en cada filtro, según el procedimiento descrito por APHA *et al.* (1992). Una vez realizada la extracción, se procedió a centrifugar la muestra y al análisis del extracto. Las medidas de absorbancia se realizaron a 630, 647, 664 y 750 nm según se describe en el método tricromático para la determinación de clorofila de APHA (APHA *et al.*, 1989).
- V. Se realizó el espectro de absorbancia del extracto.

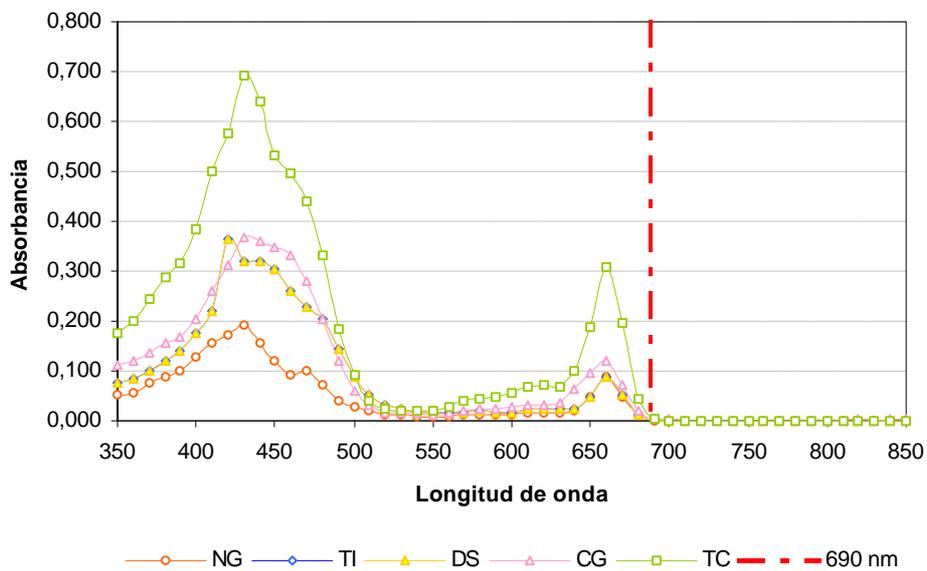
Las siguientes tablas y figuras muestran un resumen de los resultados obtenidos:

ESPECTROS DE TURBIDEZ DEL CULTIVO DE ALGAS Y DEL EXTRACTO DE PIGMENTOS

Espectro de absorbancia
-Cultivo de algas-



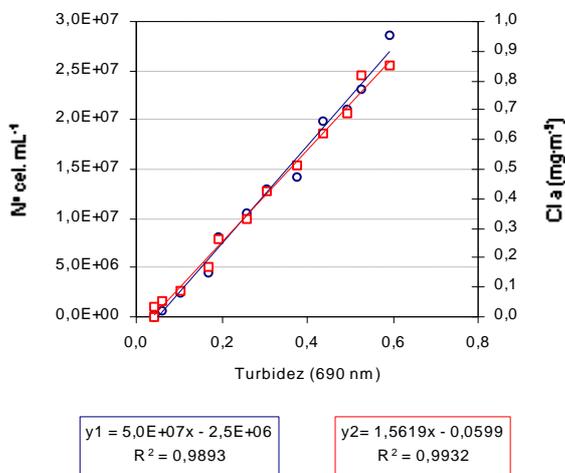
Espectro de absorbancia
-Extracción con Acetona (90% v/v)-



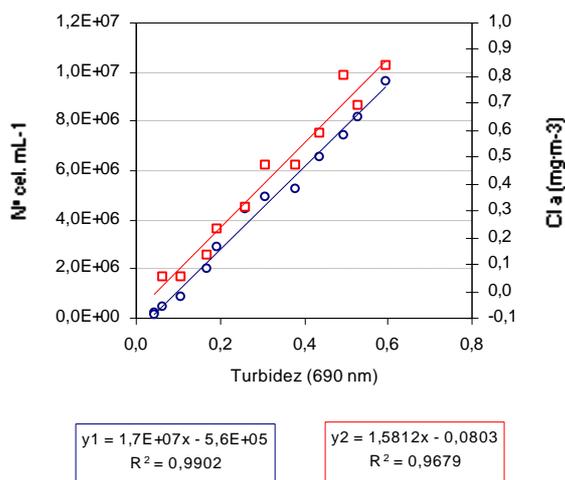
RELACIÓN TURBIDEZ—Nº CÉLULAS—CLOROFILA *a*

Tabla C III.7a. Prensayos de calibración.
Valores de turbidez, número de células y clorofila *a* obtenidos en diferentes cultivos de algas

| <i>N. gaditana</i> | | | | | |
|--------------------|-------------------|---------|--------------------------|----------|----------------------------------|
| | Turbidez (690 nm) | | Nº Cél. mL ⁻¹ | | Cl <i>a</i> (mg/m ³) |
| | Media | DesvEst | Media | DesvEst | |
| D1 | 0,594 | 0,004 | 2,85E+07 | 1,67E+02 | 0,854 |
| D2 | 0,525 | 0,003 | 2,30E+07 | 1,82E+02 | 0,818 |
| D3 | 0,493 | 0,002 | 2,10E+07 | 2,73E+02 | 0,688 |
| D4 | 0,438 | 0,008 | 1,98E+07 | 3,47E+02 | 0,620 |
| D5 | 0,377 | 0,006 | 1,41E+07 | 1,57E+02 | 0,512 |
| D6 | 0,308 | 0,005 | 1,30E+07 | 2,86E+02 | 0,423 |
| D7 | 0,258 | 0,006 | 1,05E+07 | 1,67E+02 | 0,332 |
| D8 | 0,194 | 0,005 | 8,16E+06 | 1,67E+02 | 0,265 |
| D9 | 0,168 | 0,002 | 4,40E+06 | 4,66E+01 | 0,166 |
| D10 | 0,105 | 0,001 | 2,46E+06 | 3,66E+01 | 0,089 |
| D11 | 0,061 | 0,001 | 5,80E+05 | 2,06E+01 | 0,055 |
| D12 | 0,045 | 0,003 | 1,20E+05 | 4,32E+00 | 0,032 |
| D13 | 0,042 | 0,002 | 1,09E+04 | 1,59E+01 | 0,000 |



| <i>I. galbana</i> | | | | | |
|-------------------|-------------------|---------|--------------------------|----------|----------------------------------|
| | Turbidez (690 nm) | | Nº Cél. mL ⁻¹ | | Cl <i>a</i> (mg/m ³) |
| | Media | DesvEst | Media | DesvEst | |
| D1 | 0,769 | 0,001 | 9,68E+06 | 7,35E+01 | 0,847 |
| D2 | 0,718 | 0,002 | 8,19E+06 | 6,65E+01 | 0,693 |
| D3 | 0,655 | 0,002 | 7,49E+06 | 3,25E+01 | 0,805 |
| D4 | 0,576 | 0,002 | 6,54E+06 | 1,84E+01 | 0,591 |
| D5 | 0,508 | 0,004 | 5,23E+06 | 6,93E+01 | 0,470 |
| D6 | 0,440 | 0,005 | 4,96E+06 | 1,27E+01 | 0,471 |
| D7 | 0,388 | 0,003 | 4,42E+06 | 1,98E+01 | 0,315 |
| D8 | 0,295 | 0,007 | 2,90E+06 | 2,83E+01 | 0,237 |
| D9 | 0,201 | 0,004 | 2,00E+06 | 8,49E+00 | 0,137 |
| D10 | 0,119 | 0,004 | 8,80E+05 | 1,13E+01 | 0,058 |
| D11 | 0,094 | 0,006 | 4,90E+05 | 9,90E+00 | 0,057 |
| D12 | 0,075 | 0,004 | 2,20E+05 | 0,00E+00 | 0,057 |
| D13 | 0,074 | 0,003 | 1,50E+05 | 4,24E+00 | 0,000 |



| <i>D. salina</i> | | | | | |
|------------------|-------------------|---------|--------------------------|----------|----------------------------------|
| | Turbidez (690 nm) | | Nº Cél. mL ⁻¹ | | Cl <i>a</i> (mg/m ³) |
| | Media | DesvEst | Media | DesvEst | |
| D1 | 0,959 | 0,004 | 4,20E+06 | 1,70E+01 | 3,433 |
| D2 | 0,860 | 0,005 | 3,92E+06 | 5,66E+01 | 2,761 |
| D3 | 0,801 | 0,009 | 3,48E+06 | 5,66E+00 | 2,322 |
| D4 | 0,718 | 0,001 | 2,72E+06 | 1,13E+01 | 2,002 |
| D5 | 0,510 | 0,008 | 2,00E+06 | 1,56E+01 | 2,058 |
| D6 | 0,425 | 0,003 | 1,76E+06 | 5,66E+01 | 1,353 |
| D7 | 0,335 | 0,004 | 9,90E+05 | 1,56E+01 | 1,066 |
| D8 | 0,220 | 0,007 | 7,20E+05 | 2,83E+00 | 0,669 |
| D9 | 0,139 | 0,003 | 4,30E+05 | 4,24E+00 | 0,386 |
| D10 | 0,120 | 0,004 | 2,90E+05 | 1,41E+00 | 0,366 |
| D11 | 0,101 | 0,006 | 2,80E+05 | 2,83E+00 | 0,135 |
| D12 | 0,071 | 0,005 | 1,50E+05 | 4,24E+00 | 0,078 |
| D13 | 0,053 | 0,003 | 1,00E+05 | 2,83E+00 | 0,063 |

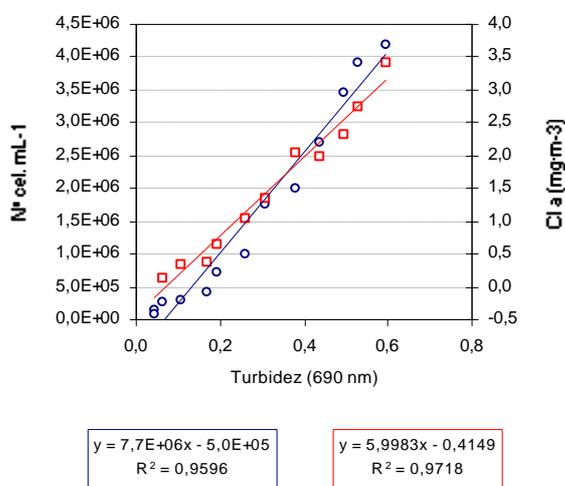
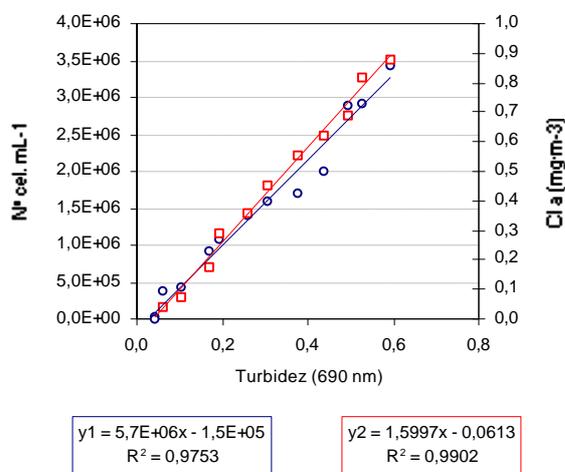
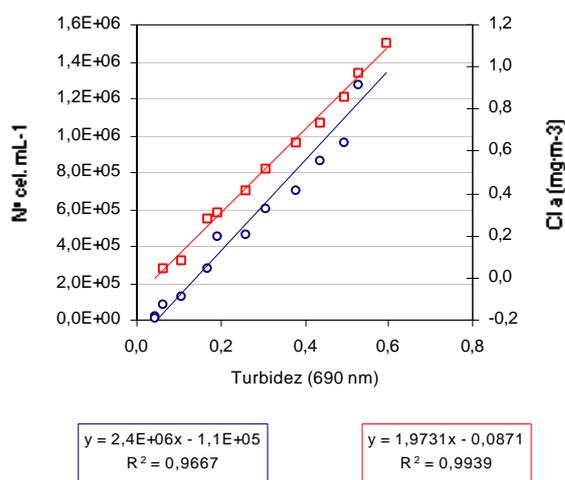


Tabla C III.7a. Prensayos de calibración (cont.)
Valores de turbidez, número de células y clorofila a obtenidos en diferentes cultivos de algas

| C. gracilis | | | | | |
|--------------------|-------------------|---------|--------------------------|----------|---------------------------|
| | Turbidez (690 nm) | | Nº Cél. mL ⁻¹ | | Cl a (mg/m ³) |
| | Media | DesvEst | Media | DesvEst | |
| D1 | 0,672 | 0,001 | 3,44E+06 | 4,53E+01 | 0,875 |
| D2 | 0,638 | 0,010 | 2,91E+06 | 3,39E+01 | 0,820 |
| D3 | 0,555 | 0,007 | 2,88E+06 | 1,41E+02 | 0,687 |
| D4 | 0,505 | 0,006 | 2,00E+06 | 0,00E+00 | 0,622 |
| D5 | 0,446 | 0,005 | 1,71E+06 | 4,53E+01 | 0,555 |
| D6 | 0,355 | 0,003 | 1,60E+06 | 2,83E+01 | 0,455 |
| D7 | 0,310 | 0,003 | 1,41E+06 | 2,83E+01 | 0,356 |
| D8 | 0,236 | 0,004 | 1,09E+06 | 3,39E+01 | 0,289 |
| D9 | 0,164 | 0,006 | 9,07E+05 | 3,39E+01 | 0,178 |
| D10 | 0,139 | 0,006 | 4,27E+05 | 1,13E+01 | 0,077 |
| D11 | 0,074 | 0,005 | 3,73E+05 | 2,83E+01 | 0,044 |
| D12 | 0,050 | 0,002 | 3,00E+04 | 1,50E+01 | 0,012 |
| D13 | 0,036 | 0,005 | 1,00E+04 | 1,10E+01 | 0,003 |



| T. chuii | | | | | |
|-----------------|-------------------|---------|--------------------------|----------|---------------------------|
| | Turbidez (690 nm) | | Nº Cél. mL ⁻¹ | | Cl a (mg/m ³) |
| | Media | DesvEst | Media | DesvEst | |
| D1 | 0,711 | 0,007 | 1,50E+06 | 1,70E+01 | 1,119 |
| D2 | 0,634 | 0,005 | 1,28E+06 | 3,39E+01 | 0,968 |
| D3 | 0,588 | 0,012 | 9,60E+05 | 8,49E+00 | 0,863 |
| D4 | 0,509 | 0,054 | 8,60E+05 | 1,98E+01 | 0,738 |
| D5 | 0,495 | 0,013 | 7,00E+05 | 1,13E+01 | 0,641 |
| D6 | 0,450 | 0,062 | 6,10E+05 | 1,27E+01 | 0,516 |
| D7 | 0,369 | 0,034 | 4,70E+05 | 4,24E+00 | 0,411 |
| D8 | 0,289 | 0,044 | 4,50E+05 | 7,07E+00 | 0,315 |
| D9 | 0,205 | 0,059 | 2,80E+05 | 1,70E+01 | 0,285 |
| D10 | 0,118 | 0,036 | 1,30E+05 | 4,24E+00 | 0,083 |
| D11 | 0,076 | 0,014 | 9,00E+04 | 7,07E+00 | 0,050 |
| D12 | 0,063 | 0,002 | 2,00E+04 | 2,83E+00 | 0,000 |
| D13 | 0,050 | 0,019 | 1,00E+04 | 1,41E+00 | 0,000 |



A la vista de los resultados obtenidos en estos ensayos de calibración se obtuvieron las siguientes conclusiones:

Se ha representado el espectro de turbidez de un cultivo en fase exponencial de crecimiento de cada alga seleccionada. Esta figura muestra un espectro, de intensidad y forma específica para cada alga. Por otra parte, la longitud de onda prefijada en varios protocolos de toxicidad para una estimación rápida de la biomasa es de 750 nm (APHA *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1994). Para los ensayos realizados, se ha utilizado la longitud de onda de 690 nm por tres motivos fundamentales.

El primero se reduce a motivos técnicos. Al objeto de reducir posibles alteraciones del medio de cultivo y puesto que se realizarán medidas diarias de la biomasa de los cultivos, es más conveniente utilizar un aparato de medida que permita medir directamente la turbidez del cultivo frente a cualquier otro sistema para el cual haya que manipular el contenido de los cultivos o tratamientos de ensayo. Por ello, para la realización de los ensayos se ha preferido contar con un colorímetro con adaptador de tubos de ensayo y

filtro fijo de 690 nm, frente a la utilización un espectrofotómetro con la posibilidad de seleccionar cualquier longitud de onda del espectro visible.

La segunda razón esta basada en el espectro representado (gráfico superior). Podemos observar que la longitud de onda de 690 nm se localiza muy próximo al pico de absorbancia que produce la clorofila. Por tanto, la biomasa estimada a partir de medidas de turbidez a longitudes de onda seleccionadas en estos máximos serán más precisos que la obtenida a partir de medidas de turbidez a 750 nm. Otros autores seleccionan la longitud de onda de 450 m, (Riva, 1998; Aguayo *et al.*, 2000). Esta longitud coincide también con una zona de máxima absorbancia la cual puede estar producida por la presencia de otros pigmentos (de la Rosa *et al.*, 1990).

Una vez seleccionada la longitud de onda adecuada para la turbidez de los cultivos, se procedió a establecer las relaciones entre los diferentes estimadores de biomasa tal y como recomiendan algunos procedimientos (Lewis, *et al.*, 1994). Las gráficas muestran como la correspondencia *turbidez vs. número de células*, y *turbidez vs. clorofila a* de todas las algas, presentan relaciones lineales con coeficientes de regresión muy significativos.

A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionó la **turbidez de los cultivos como estimador de la biomasa en los ensayos de toxicidad**.

Además de las razones apuntadas anteriormente y a los resultados obtenidos, hay que decir que **este método es fácil, rápido, poco costoso y necesita muy poca infraestructura**. Además, y en función de los objetivos de este trabajo de investigación, es el método más viable y que permite medir mayor número de muestras en un corto periodo de tiempo.

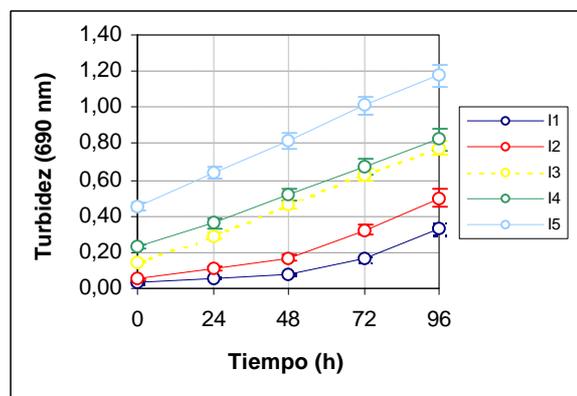
3.1.3.2.1.2. Obtención del inóculo óptimo de ensayo

Una vez que se ha determinado que la medida más adecuada para realizar el seguimiento del crecimiento de los tratamientos es la medida de turbidez, ha sido necesario realizar un estudio relativo al valor óptimo de la concentración del inóculo basado en medidas de turbidez.

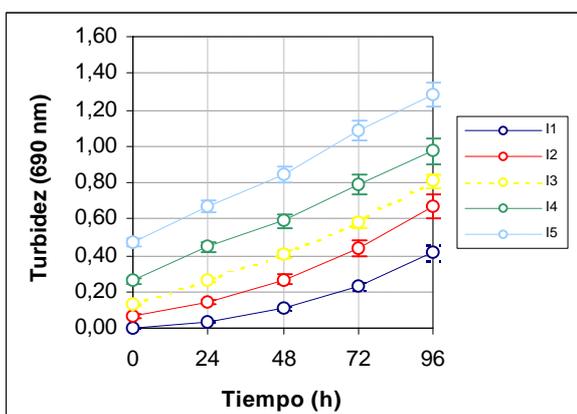
Para ello se realizaron cultivos de las diferentes especies en viales similares a los que se utilizarían posteriormente para los ensayos. Con objeto de observar la influencia del inóculo, para cada alga se realizaron varios cultivos con diferentes concentraciones iniciales de biomasa. Cada 24 horas se realizaron lecturas de la turbidez a 690 nm. En la tabla siguiente se recogen los resultados obtenidos en estas experiencias.

Tabla C III.7b.
Valores de absorbancia obtenidos en el experimento realizado para determinar la concentración inicial en ensayos de toxicidad con microalgas.

| <i>Nannochloropsis gaditana</i> | | | | | |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| t(h) | I1 | I2 | I3 | I4 | I5 |
| 0 | 0,029 | 0,050 | 0,147 | 0,231 | 0,450 |
| 24 | 0,057 | 0,111 | 0,291 | 0,359 | 0,636 |
| 48 | 0,081 | 0,170 | 0,460 | 0,518 | 0,815 |
| 72 | 0,162 | 0,325 | 0,625 | 0,673 | 1,013 |
| 96 | 0,331 | 0,500 | 0,775 | 0,823 | 1,176 |
| r^2 | 0,847 | 0,940 | 0,999 | 0,999 | 0,999 |



| <i>Isochrysis galbana</i> | | | | | |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| t(h) | I1 | I2 | I3 | I4 | I5 |
| 0 | 0,001 | 0,066 | 0,129 | 0,259 | 0,473 |
| 24 | 0,038 | 0,142 | 0,260 | 0,444 | 0,673 |
| 48 | 0,113 | 0,268 | 0,405 | 0,587 | 0,842 |
| 72 | 0,234 | 0,441 | 0,577 | 0,788 | 1,083 |
| 96 | 0,415 | 0,665 | 0,806 | 0,970 | 1,282 |
| r^2 | 0,929 | 0,964 | 0,987 | 0,998 | 0,998 |



| <i>Dunaliella salina</i> | | | | | |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| t(h) | I1 | I2 | I3 | I4 | I5 |
| 0 | 0,054 | 0,142 | 0,250 | 0,501 | 0,903 |
| 24 | 0,104 | 0,247 | 0,445 | 0,716 | 1,126 |
| 48 | 0,253 | 0,539 | 0,776 | 1,042 | 1,383 |
| 72 | 0,605 | 0,897 | 1,072 | 1,284 | 1,630 |
| 96 | 0,889 | 1,109 | 1,273 | 1,600 | 1,954 |
| r^2 | 0,927 | 0,975 | 0,992 | 0,996 | 0,996 |

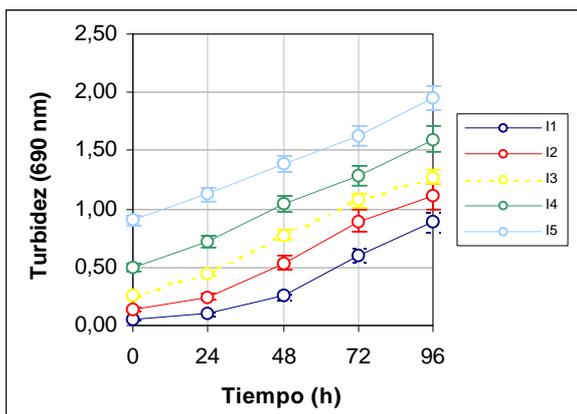
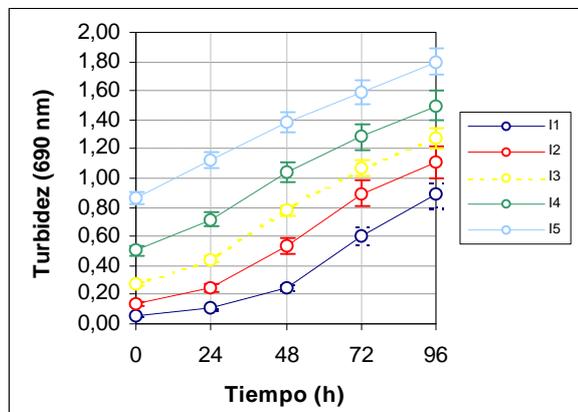


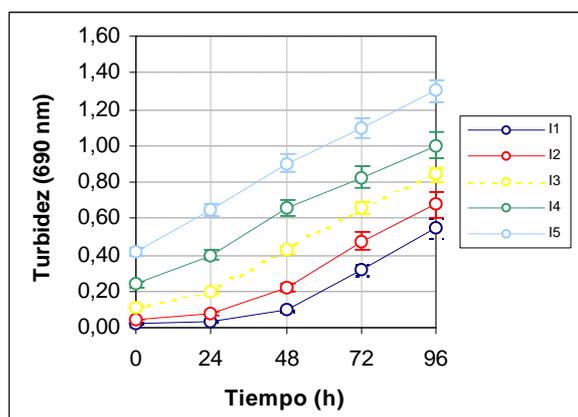
Tabla C III.7. (cont.)

Valores de absorbancia obtenidos en el experimento realizado para determinar la concentración inicial en ensayos de toxicidad con microalgas.

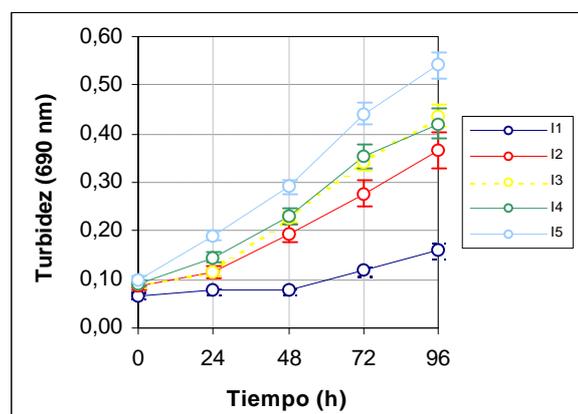
| <i>Chaetoceros gracilis</i> | | | | | |
|-----------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| t(h) | I1 | I2 | I3 | I4 | I5 |
| 0 | 0,054 | 0,142 | 0,272 | 0,501 | 0,860 |
| 24 | 0,104 | 0,247 | 0,445 | 0,716 | 1,126 |
| 48 | 0,253 | 0,539 | 0,776 | 1,042 | 1,383 |
| 72 | 0,605 | 0,897 | 1,072 | 1,284 | 1,590 |
| 96 | 0,889 | 1,109 | 1,273 | 1,500 | 1,800 |
| r ² | 0,927 | 0,975 | 0,990 | 0,995 | 0,996 |



| <i>Tetraselmis chuii</i> | | | | | |
|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| t(h) | I1 | I2 | I3 | I4 | I5 |
| 0 | 0,027 | 0,044 | 0,112 | 0,240 | 0,416 |
| 24 | 0,037 | 0,075 | 0,197 | 0,398 | 0,647 |
| 48 | 0,094 | 0,223 | 0,425 | 0,658 | 0,904 |
| 72 | 0,320 | 0,475 | 0,661 | 0,827 | 1,098 |
| 96 | 0,549 | 0,674 | 0,840 | 1,002 | 1,299 |
| r ² | 0,864 | 0,942 | 0,982 | 0,994 | 0,997 |



| <i>Thalassiosira pseudonana</i> | | | | | |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| t(h) | I1 | I2 | I3 | I4 | I5 |
| 0 | 0,066 | 0,087 | 0,089 | 0,092 | 0,101 |
| 24 | 0,077 | 0,116 | 0,114 | 0,145 | 0,190 |
| 48 | 0,076 | 0,195 | 0,227 | 0,231 | 0,290 |
| 72 | 0,117 | 0,277 | 0,340 | 0,352 | 0,441 |
| 96 | 0,161 | 0,366 | 0,437 | 0,421 | 0,542 |
| r ² | 0,843 | 0,975 | 0,970 | 0,985 | 0,992 |



Para determinar el inóculo a partir del cual se consigue un crecimiento exponencial, se ha calculado el coeficiente de regresión del ajuste lineal de cada tratamiento. A partir del tratamiento en el cual se estabiliza el coeficiente, se ha considerado que el valor inicial de absorbancia es el óptimo para el correcto desarrollo de los ensayos. A efectos prácticos se ha construido una tabla resumen indicando los valores orientativos de biomasa inicial expresados en términos de turbidez.

Tabla C III.8.
Concentraciones iniciales mínimas necesarias para obtener crecimiento exponencial en los ensayos de toxicidad con microalgas

| Especie | Concentración inicial de biomasa Turbidez (690 nm) |
|---|---|
| <i>Nannochloropsis gaditana</i> | ~ 0,150 |
| <i>Isochrysis galbana</i> | ~ 0,260 |
| <i>Dunaliella salina</i> | ~ 0,250 |
| <i>Chaetoceros gracillis</i> | ~ 0,270 |
| <i>Tetraselmis chuii</i> | ~ 0,240 |
| <i>Thalassiosira pseudonana</i> | ~ 0,100 |
| A efectos prácticos se considerarán inóculos adecuados aquellos que muestren una absorbancia inicial entre 0,200 y 0,300. | |
| En el caso de <i>Thalassiosira pseudonana</i> este rango será inferior | |

3.1.3.2.2. PROCEDIMIENTO DE ENSAYO DE TOXICIDAD DE COMPUESTOS ESPECÍFICOS

3.1.3.2.2.1. Resumen del procedimiento

Para cada compuesto se realizó un preensayo de toxicidad con el objeto de encontrar el rango óptimo de concentraciones de ensayo.

Una vez seleccionado el rango óptimo de ensayo se fabricaron disoluciones patrones utilizando como agua de dilución agua de mar sintética esterilizada abonada con medio nutriente.

Todo el material de vidrio utilizado en los ensayos fue material esterilizado en autoclave, limpio y seco, mediante un procedimiento de limpieza especial (Anexo XIII). Para la adición de los patrones, y los inóculos se utilizó una pipeta automática (Transferpette®, Marca Brand, Prod. No. 504182) con puntas estériles desechables (Plastribrand®, Marca Brand, Prod. No. 702595).

Por cada concentración de tóxico y para cada microalga se dispusieron tres viales a los cuales se les añadió 2 mL de la disolución de tóxico correspondiente.

Una vez preparados todos los viales con las concentraciones de tóxico se procedió a inocularlos con 2 mL de cada monocultivo de algas. Previamente se realizaron simulaciones en viales adicionales con el objeto de conseguir inicialmente un inóculo el cual, al añadirlo a cada uno de los tratamientos, mostrara una absorbancia inicial correspondiente a la fase inicial de crecimiento exponencial. Esta inoculación se realizó en un periodo de tiempo inferior a 10 minutos con el objeto de que todos los viales del ensayo de un monocultivo concreto presentasen la misma biomasa inicial.

Puesto que estamos añadiendo un volumen de inóculo igual al volumen de tóxico, estamos realizando una dilución controlada de éste (dilución ½). Por tanto, si queremos ensayar una determinada concentración o rango de concentraciones, tenemos que fabricar los patrones al doble concentrados. Mediante esta forma de fabricar los tratamientos conseguimos dos objetivos: (1) Evitar el procedimiento de centrifugación y concentración descrito en los diversos protocolos de toxicidad con algas,

procedimiento que puede generar un estrés al alga y por tanto anomalías en el crecimiento natural de la población; y (2) evitamos la dilución no controlada del tóxico al añadir posteriormente un volumen muy pequeño de inóculo concentrado.

Por cada alga se incluyeron dos controles cada uno de ellos por triplicado. El control del ensayo se construyó añadiendo 2 mL de agua de mar sintética esterilizada y abonada con medio nutriente más 2 mL de inóculo de microalga. Además, se incluyó un control de inóculo el cual se fabricó añadiendo 2 mL de agua de mar sintética esterilizada sin aporte de nutrientes. Este último control tuvo como objeto el control de la calidad del inóculo de algas. Al utilizar la medida de turbidez como medida de biomasa de los cultivos, no tenemos conocimiento del estado de salud de las células del cultivo con el que vamos a inocular, y podríamos estar cometiendo el error de estar inoculando con un cultivo viejo con un alto porcentaje de células viejas. Teóricamente el cultivo con el que se inocula se corresponde con un cultivo en fase exponencial de crecimiento de 7 a 10 días de edad, fase en la cual el cultivo está formado por células jóvenes y con grandes reservas internas para el mantenimiento celular. Con el control del inóculo construido estamos realizando una estimación de la edad de las células. Así, en cultivos jóvenes y en ausencia de nutrientes en el medio, las microalgas utilizan las reservas para mantenimiento y reproducción y por tanto el cultivo crece mostrando este crecimiento como un aumento paulatino y rápido de la turbidez. Si el cultivo fuese viejo, las reservas de las células están agotadas y el crecimiento del cultivo se muestra muy lento e incluso en ocasiones existe una disminución de la absorbancia.

3.1.3.2.2. Medidas del crecimiento

Transcurridos 30 min desde la inoculación de las algas, tiempo que se deja para la estabilización del nuevo cultivo, se procedió a la medida de la biomasa inicial de cada vial en términos de turbidez a 690 nm (t_0 y B_0).

Cada 24 horas durante 4 días (0, 24, 48, 72 y 96 horas) se midió el crecimiento de los cultivos mediante medidas de turbidez a 690 nm en un colorímetro (Nannocolor® PT-3 MACHEREY-NAGEL). La medida se realizó directamente en el vial de ensayo, por cuadruplicado, girando el tubo un cuarto de vuelta aproximadamente en cada medida con el objeto de evitar irregularidades del vidrio. Previamente a cada medida, se agitó la muestra con un agitador (Heidolph, REAXControl) a 1500 rpm durante ~30 segundos, con el objeto de homogeneizar la muestra para la medida de absorbancia y para facilitar el intercambio de gases con la atmósfera.

Al cabo de las 96 horas se tomaron dos réplicas de cada concentración y se fijaron con formaldehído para recuento y observación al microscopio en caso de que los resultados obtenidos a partir de medidas de turbidez no fueran concluyentes, y por supuesto, para comprobar que al final del ensayo cada tratamiento es un monocultivo del microalga en cuestión. La tercera réplica se mantuvo en la incubadora y se tomaron lecturas de absorbancia a los 6, 8 y 10 días de ensayo al objeto de obtener información adicional de la evolución de la toxicidad.

3.1.3.2.3. Tratamiento de los resultados

Los valores de absorbancia obtenidos en todos los ensayos realizados fueron recogidos diariamente en plantillas de datos como la que figura en la Tabla C III.9.

Tabla C III.9.
Modelo de plantilla de datos empleada para anotar los datos de absorbancia en los ensayos de toxicidad con microalgas

| Ensayo de toxicidad del compuesto _____ con el microalga _____ | | | | | | |
|--|-----------|-------------|-------|-------|-------|----------|
| t = ____ horas | | Fecha _____ | | | | |
| Tratamientos | Réplicas | Abs 1 | Abs 2 | Abs 3 | Abs 4 | Promedio |
| Control | Réplica 1 | | | | | |
| | Réplica 2 | | | | | |
| | Réplica 3 | | | | | |
| Patrón 1 ____ mg/L | Réplica 1 | | | | | |
| | Réplica 2 | | | | | |
| | Réplica 3 | | | | | |
| ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... |
| Patrón 10 ____ mg/L | Réplica 1 | | | | | |
| | Réplica 2 | | | | | |
| | Réplica 3 | | | | | |

Una vez terminado el ensayo, se procedió al análisis de resultados.

Los factores respuesta que se han analizado en los ensayos de toxicidad con microalgas, están basados en los efectos adversos sobre el crecimiento de la población. Los valores de la EC_p (concentración que produce un efecto a un porcentaje p del total de la población), son calculados usando técnicas de estimación de puntos, y los valores de los parámetros $LOEC$ (concentración más baja que produce efecto) y $NOEC$ (concentración más baja que no produce efecto) para el crecimiento, son obtenidos por medio de aproximaciones de contraste de hipótesis, como el procedimiento de Dunnett (Dunnett, 1964) o el de Steel (Steel y Torrie, 1960).

Para la realización del procedimiento de Dunnett es necesario que el conjunto de datos presente una distribución normal y que las réplicas presenten varianza homogénea. Por tanto, para un correcto análisis del ensayo, y previamente a la aplicación del procedimiento de Dunnett, es necesario comprobar la condición de *normalidad* y *homogeneidad*.

El análisis estadístico utilizado en los ensayos de toxicidad con microalgas se encuentra resumido en el diagrama presentado en la siguiente figura, donde se puede comprobar cómo el análisis empleado en la estimación del $NOEC$ y el $LOEC$ es distinto del usado para estimar los efectos EC_p .

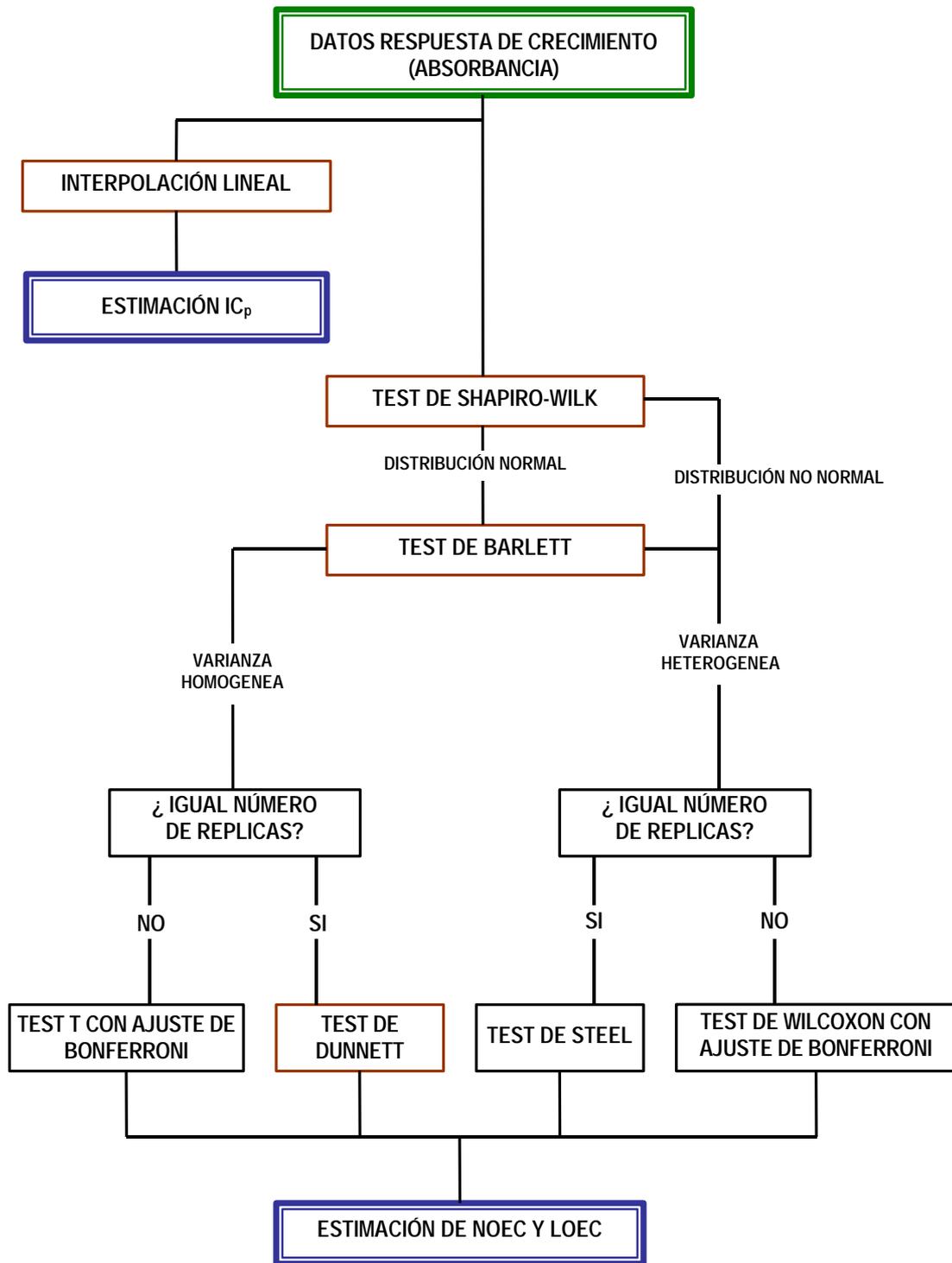


FIGURA C III.8.

Esquema del procedimiento seguido para el tratamiento estadístico de los resultados de los ensayos de toxicidad con microalgas

El análisis estadístico usando contraste de hipótesis incluye un test paramétrico, el procedimiento de Dunnett, y en el caso de resultados no paramétricos el procedimiento a emplear es el propuesto por Steel. Las dos condiciones necesarias para la aplicación del test de Dunnett son: (1) la forma de la distribución de los datos obtenidos deben ajustarse a una distribución normal, y (2) la varianza del conjunto de datos debe ser homogénea.

Tal y como recomiendan los procedimientos de análisis de datos con microalgas consultados, para determinar la normalidad, el test estadístico adecuado para el número de datos que obtendríamos sería el test de Shapiro-Wilk, mientras que para comprobar la homogeneidad de la varianza el test recomendado es el test de Barlett (Weber, 1993; Lewis *et al.* 1994). Si cualquiera de estas dos pruebas fallasen, para el cálculo del *NOEC* y el *LOEC* se usaría el test no paramétrico de Steel. Además, si el número de réplicas usadas en las diferentes concentraciones ensayadas no fuese igual, hay otras dos pruebas de contraste alternativas, paramétrica y no paramétrica, el ensayo de Bonferroni (paramétrico) y el de Wilcoxon con el ajuste de Bonferroni (no-paramétrico).

A continuación se resume en qué consiste cada una de las pruebas empleadas.

3.1.3.2.2.3.1. DETERMINACIÓN DE LOS VALORES NOEC Y LOEC

3.1.3.2.2.3.1.1. Ensayo de normalidad. Test de Shapiro-Wilk

El test de Shapiro Wilk es una prueba estadística formal que determina la condición de normalidad de un conjunto de resultados de toxicidad (Conover, 1980). El estadístico *W* se obtiene dividiendo el cuadrado de una combinación lineal apropiada de la muestras ordenada estadísticamente, por una estimación simétrica de la varianza. El *W* calculado debe ser mayor que 0 y menor o igual que 1. Este test se recomienda cuando el tamaño de la muestra es menor o igual que 50. Si el tamaño de la muestra es mayor de 50, se recomienda utilizar el estadístico *D* de Kolmogorov (Stephens, 1974).

El primer paso en el ensayo de la normalidad consiste en centrar las observaciones obtenidas, restando el valor medio de cada concentración a cada uno de los valores de las réplicas.

A continuación se calcula el término *D* del test estadístico mediante la siguiente ecuación:

$$D = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}$$

donde:

X_i es la *i*-ésima observación centrada;

\bar{X} es la media global de las observaciones centradas; y

n es el número total de observaciones.

Seguidamente se ordenan todas las observaciones de menor a mayor:

$$X^{(1)} \leq X^{(2)} \leq X^{(3)} \leq X^{(4)} \dots \leq X^{(n)}$$

Donde $X^{(i)}$ es la *i*-ésima observación ordenada.

A partir de la Tabla A XII.1 del Anexo XII, para un número de datos *n*, se obtienen los coeficientes $a_1, a_2, a_3, \dots, a_k$, donde *k* es igual a $n/2$ si *n* es par y $(n-1)/2$ si *n* es impar. Seguidamente se calcula el parámetro estadístico *W* según la ecuación:

$$W = \frac{1}{D} \cdot \sum_{i=1}^k a_i \cdot (x^{(n-i+1)} - x^{(i)})^2$$

La toma de decisión para este ensayo consiste en comparar el valor obtenido de W con el valor crítico mostrado en la Tabla A XII.2 del Anexo XII. Si el valor W calculado es superior al W crítico, se concluye que los datos presentan una distribución normal.

3.1.3.2.2.3.1.2. Test para el estudio de la homogeneidad de la varianza

Para aplicar el procedimiento de Dunnett y la prueba t con el ajuste de Benferroni, la varianza de los datos obtenidos para cada concentración de tóxico y las del control deben ser iguales. En caso de no ser homogénea, será necesario realizar una transformación de los resultados como veremos más adelante. Cuando se tienen dos tratamientos, la prueba estadística indicada para estudiar la igualdad de la varianza es la prueba F en la cual se divide la mayor varianza por la menor varianza para calcular el valor F . Para estudios con más de dos tratamientos se utiliza la prueba de Barlett (Snedecor y Cochran, 1980; Lewis *et al.*, 1994; Rand, 1995)

Para el estudio de la homogeneidad de la varianza según la prueba de Barlett, en primer lugar se calcula el parámetro B de la siguiente forma:

$$B = \frac{\sum_{i=1}^p V_i \cdot \ln \bar{S}^2 - \sum_{i=1}^p V_i \cdot \ln S_i^2}{C}$$

donde:

V_i son los grados de libertad de cada concentración de tóxico y el control, $V_i = (n_i - 1)$;
 p es el número de niveles de tóxico, incluido el control; y
 n_i es el número de réplicas para la concentración i .

$$\bar{S}^2 = \frac{\sum_{i=1}^p V_i \cdot S_i^2}{\sum_{i=1}^p V_i}$$

S_i es la desviación estándar para la concentración i .

$$C = 1 + \frac{1}{3 \cdot (p - 1)} \cdot \sum_{i=1}^p \frac{1}{V_i} - \frac{1}{\sum_{i=1}^p V_i}$$

B presenta una distribución aproximada a la *chi-cuadrada* con $p-1$ grados de libertad, cuando las varianzas son similares, de modo que, cuando el valor calculado de B es inferior al valor B crítico (Tabla A XII.1 del Anexo XII) se concluye que las varianzas son homogéneas.

3.1.3.2.2.3.1.3. Procedimiento de Dunnett

El procedimiento de Dunnett (Dunnett, 1964) se usa para comparar la media de cada concentración con la media del control para decidir cuáles concentraciones difieren significativamente del control. Para ello se considera que las observaciones son independientes y se ajustan a una distribución normal. Además considera que la varianza de las observaciones es homogénea a lo largo de todas las concentraciones y el control. Este procedimiento sólo se puede utilizar cuando el número de réplicas de cada concentración de tóxico y el control son iguales. En caso contrario, debe utilizarse una prueba t con ajuste de Benferroni.

Para obtener una estimación de la varianza conjunta para el procedimiento Dunnett, se construye una tabla ANOVA como la descrita a continuación:

Tabla C III.10.
Tabla de resultados del análisis de varianza ANOVA para el procedimiento Dunnett

| Fuente | df | Suma de cuadrados (SS) | Cuadrado medio (MS) (SS/df) |
|------------------|-----|------------------------|-----------------------------|
| Entre grupos | p-1 | SSB | $S_B^2 = \frac{SSB}{(p-1)}$ |
| Dentro del grupo | N-p | SSW | $S_W^2 = \frac{SSW}{(N-p)}$ |
| Total | N-1 | SST | |

donde:

p es el número de concentraciones de tóxico ensayadas, incluido el control;

N es el número total de observaciones; y

n_i es el número de observaciones a la concentración i .

$$SSB = \sum_{i=1}^p \frac{T_i^2}{n_i} - \frac{G^2}{N} \quad (\text{suma de cuadrados entre grupos})$$

$$SST = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^{n_i} Y_{ij}^2 - \frac{G^2}{N} \quad (\text{suma total de cuadrados})$$

$$SSW = SST - SSB$$

$$G = \sum_{i=1}^p T_i$$

G es la suma de todos los datos obtenidos;

T_i es la suma de los datos para una concentración i ; y

Y_j es el dato de la réplica j para la concentración i .

Para realizar comparaciones individuales, se realiza una prueba t para cada combinación control-concentración i , del siguiente modo:

$$t_i = \frac{(\bar{Y}_1 - \bar{Y}_i)}{S_w \cdot \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_i}}}$$

donde:

\bar{Y}_1 es la concentración media de microalgas en el control;

\bar{Y}_i es la concentración media de microalgas a la concentración de tóxico i ;

n_1 es el número de réplicas del control;

n_i es el número de réplicas de la concentración i ; y

S_w es el cuadrado medio entre suma de cuadrados.

Dado que el propósito de este test es detectar una reducción significativa en la concentración media de microalgas, el test de una cola es el más apropiado. Los valores críticos de t para el test de una cola se encuentran recogidos en la Tabla A XII.4 del Anexo XII. De este modo, la concentración más elevada que presente un valor de t superior al t crítico será el valor del *NOEC* experimental, mientras que la concentración más baja con un valor de t inferior al valor t crítico supondrá el valor del *LOEC* experimental.

La sensibilidad del ensayo de toxicidad realizado, puede cuantificarse mediante una estimación de la diferencia mínima significativa (*MSD: Minimum Significance Difference*). Para ello se emplea la siguiente expresión:

$$MSD = d \cdot S_w \cdot \sqrt{\left(\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n}\right)}$$

donde:

d es el valor crítico para el procedimiento de Dunnett;

S_w es el cuadrado medio entre sumas de cuadrados;

n es el número de réplicas; y

n_1 es el número de réplicas en el control.

Si los datos no se han transformado, debe indicarse la *MSD* junto con el porcentaje de decrecimiento respecto a la media del control.

En el caso en el que los datos se hayan transformado, la *MSD* debe transformar sus unidades. En este caso, se puede realizar la siguiente conversión en unidades no-transformadas de *MSD*. Para ello hay que restar la *MSD* de la media del control transformado. A este valor lo denominamos D . Después hay que obtener los valores no-transformados de la media del control y la diferencia D .

$$MSD_u = \text{control}_u - D_u$$

Donde:

MSD_u es la mínima diferencia significativa de los datos no-transformados (untransformed),

Control_u es la media del control no-transformada, y

D_u es la diferencia no-transformada.

El porcentaje de reducción del MSD_u respecto al control se representa como:

$$\text{Porcentaje de reducción} = 100 \times \frac{\text{MSD}_u}{\text{Control}_u}$$

3.1.3.2.2.3.2. ESTIMACIÓN DEL VALOR DE EC_p

Para la estimación del valor de la concentración de tóxico que provoca un determinado porcentaje de reducción p en la tasa de crecimiento de las microalgas, se ha usado el método de interpolación lineal. Dicho procedimiento considera que:

- La respuesta media de cada concentración superior es menor o igual que la respuesta media de una concentración previa (condición de monotonicidad).
- Existe una función lineal de respuesta entre concentraciones ensayadas.

El procedimiento seguido ha consistido en calcular las respuestas medias para el control y cada una de las concentraciones de tóxico ensayadas. A continuación, se comprueba si se cumple la condición de monotonicidad; de no ser así, las respuestas son "suavizadas" mediante medias con los valores adyacentes. Esto es, si la respuesta media observada a la menor de las concentraciones ensayadas M_2 es igual o menor que la media del control M_1 , se usa como respuesta. Pero si es mayor, se le hace la media con el valor del control, y esta media es usada como respuesta de ambas, la respuesta del control M_1 y la respuesta de la menor de las concentraciones M_2 . Esta media es entonces comparada con la respuesta media observada para la siguiente concentración superior de tóxico M_3 . De nuevo, si la respuesta media observada para la siguiente concentración superior es menor que la media de la respuesta del control y la menor de las concentraciones de tóxico, se usa como respuesta. Si es superior que la media de las primeras dos, se promedia con éstas, y la nueva media es usada como respuesta para el control y las dos concentraciones más bajas de tóxico. Este procedimiento continúa para los datos de las concentraciones de tóxico restantes.

Una vez asegurada la monotonicidad de los datos, el valor de la EC_p es estimado por interpolación lineal, asumiendo una respuesta lineal entre dos concentraciones ensayadas. La interpolación se realiza entre dos concentraciones cuyas respuestas contengan la respuesta de interés, esto es, el porcentaje p de reducción de la tasa de crecimiento del control.

Para estimar el valor se determinan las concentraciones C_j y C_{j+1} que engloban la respuesta:

$$M_1 = 1 - \frac{p}{100}$$

donde:

M_1 es la respuesta media "suavizada" (solo si fuese necesario) del control; y p es el porcentaje de reducción de la respuesta buscado.

Una vez conocidos C_j y C_{j+1} , se aplica la siguiente expresión para calcular la concentración que provoca un efecto p .

$$EC_p = C_j + \frac{C_{j+1} - C_j}{M_{j+1} - M_j} \left(M_1 - \frac{p}{100} \right)$$

donde:

M_j es la respuesta media de la concentración C_j ; y
 M_{j+1} es la respuesta media de la concentración C_{j+1} .

Debido al uso de una técnica de interpolación lineal para calcular un valor estimado de EC_p , los métodos estadísticos estándares para calcular intervalos de confianza no son aplicables. Esta limitación puede ser evitada mediante el uso de la técnica *bootstrap* propuesta por Efron (1986). Este método se emplea para obtener el intervalo del 95% de confianza para el valor estimado de EC_p . En el método propuesto por Efron, los datos respuesta Y_{ji} son aleatoriamente reprobados con sustitutos para producir un nuevo conjunto de datos Y_{ji}^* , que son estadísticamente equivalentes a los datos originales, pero con los que se obtienen estimaciones del EC_p (EC_p^*) nuevas y ligeramente diferentes. Este proceso es repetido al menos 80 veces (Marcus y Holtzman, 1988) (en nuestro caso se realizaron 1000 repeticiones), dando como resultado múltiples conjuntos de datos, cada uno de los cuales se encuentra asociado a un valor de EC_p^* estimado. La distribución de los EC_p^* estimados derivados de los conjuntos de datos reprobados se aproxima a la distribución muestral del EC_p estimado. El error estándar del EC_p se estima por la desviación estándar de los EC_p^* individuales. Los intervalos de confianza empíricos se obtienen de los cuantiles de la distribución empírica. Por ejemplo, si los datos del ensayo son reprobados un mínimo de 80 veces, los límites de confianza empíricos para el 2,5% y el 97,5% son aproximadamente los segundos EC_p^* estimados inferior y superior respectivamente (Marcus y Holtzman, 1988).

La realización del cálculo de estos intervalos de confianza mediante hojas de cálculo resultaría un tanto tediosa, por lo que se ha recurrido al programa informático proporcionado por la USEPA, IcPIN (Norberg-King, 1988).

3.1.3.2.2.3.3. TRANSFORMACIÓN DE DATOS DE TOXICIDAD

Cuando los datos no se ajustan a una distribución normal y la varianza no es homogénea, se suele realizar una transformación de los datos de toxicidad para resolver estos problemas, y de esta forma, los datos pueden analizarse mediante procedimientos paramétricos, los cuales son más adecuados que las técnicas no paramétricas.

Para los datos de toxicidad de microalgas marinas y en general para datos biológicos tales como medidas de biomasa, crecimiento de la población, velocidades metabólicas, etc., se utiliza una transformación logarítmica. Así pues, los datos se pueden transformar como:

$$Z = \log(X + 1)$$

Una de las ventajas que presenta esta transformación es que permite valores iguales a 0. Además, el **log(X+1)** es una mejor transformación que la expresión **log(X)**. La transformación logarítmica se aplica cuando la media puede correlacionarse de forma positiva con la desviación estándar. Así, aplicando esta transformación, la varianza se hace independiente de la media (Rand, 1995).

3.1.3.2.3. ENSAYOS DE TOXICIDAD DE VERTIDOS Y DE AGUAS RECEPTORAS

3.1.3.2.3.1. Resumen del procedimiento

Con objeto de hacer una evaluación global de la calidad de las aguas, la USEPA diseñó un ensayo de toxicidad o crecimiento microalgal con el alga de agua dulce *Selenastrum capricornotum*. Este ensayo ha sido aplicado y validado en el Programa Nacional de Investigación de la Eutrofización de los Estados Unidos (Weiss, Helms, 1971) y posteriormente fue modificado para realizar el seguimiento ambiental de las aguas receptoras, aguas residuales industriales, municipales y aguas procedentes de fuentes agrarias puntuales y difusas (Lewis *et al.*, 1994). Los efectos que se miden con estos ensayos incluyen los efectos aditivos, sinérgicos y antagónicos de todos los componentes químicos, físicos y biológicos que afectan adversamente las funciones fisiológicas y bioquímicas de los organismos de ensayo.

Basándonos en este test, y en los diferentes procedimientos para ensayar la toxicidad de las microalgas, hemos diseñado y aplicado una metodología utilizando microalgas de agua de mar. En este procedimiento, el cultivo de las microalgas, medio nutriente, composición del agua de mar sintética, condiciones de cultivo y material de cultivo y ensayo, son las mismas que las descritas en el apartado anterior.

La diferencia más significativa de este ensayo con respecto a los de compuestos específicos es el tratamiento que hay que hacer al cultivo de reserva para la obtención del inóculo. Esta variación se debe a dos causas fundamentalmente:

- (1) En los ensayos con aguas receptoras y vertidos, una de las respuestas que se investiga es el crecimiento de las microalgas en las condiciones naturales de estas muestras (nutrientes, posibles compuestos tóxicos, etc.). Por tanto, es necesario tener un inóculo "libre" de los nutrientes del medio f/2 que se adicionaron para el crecimiento del cultivo.
- (2) Hay que procurar que el volumen de inóculo sea lo más pequeño posible con objeto de diluir la muestra en cantidades mínimas de forma que la respuesta de crecimiento que obtengamos se considere que es la respuesta de la muestra sin diluir.

3.1.3.2.3.2. Inóculo

Al cabo de 7 a 10 días de incubación, los cultivos se encuentran en fase exponencial de crecimiento. En este periodo, y de 2 a 3 horas antes del comienzo del ensayo, se prepararon los inóculos de ensayo. Para ello, se centrifugaron los cultivos (2000 g y 15 min.) y se retiró el sobrenadante. Se resuspendieron en agua de mar sintética y se volvió a repetir la operación de centrifugado. En este último paso, se retiró el sobrenadante pero no se resuspendió en agua de mar sintética. Con estas operaciones se consiguió un inóculo muy concentrado y suspendido en una pequeña cantidad de agua prácticamente libre de nutrientes. Al ser un inóculo tan concentrado podremos adicionar un pequeño volumen a las muestras a ensayar con dos propósitos: (1) No diluir la muestra, y (2) añadir un número suficiente de células para el ensayo (número correspondiente a la fase inicial de crecimiento exponencial). Al haber resuspendido en agua de mar sintética "libre" de nutrientes, se consigue posteriormente, ensayar en las condiciones naturales de las muestras.

3.1.3.2.3.4. Diseño experimental

Se han desarrollado dos ensayos de forma paralela:

TEST A. Algas expuestas a las condiciones naturales de las aguas receptoras y diluciones del vertido. En este test, el control ha consistido en agua de mar sintética sin suplemento de nutrientes (Control A).

TEST B. Algas expuestas a las aguas receptoras y diluciones del vertido, añadiendo en cada muestra nutrientes hasta concentración de sobresaturación, es decir, en condiciones no limitantes de nutrientes. En este test, el control ha consistido en agua de mar sintética con un suplemento de nutrientes hasta sobresaturación (Control B).

En ambos ensayos se realizaron las siguientes adiciones:

| | <u>TEST A</u> | <u>TEST B</u> |
|--|---------------|---------------|
| <i>Volumen muestra</i> | 4 mL | 4 mL |
| V inóc. microalgas concentrado..... | 0,1 mL | 0,1 mL |
| V disolución de nutrientes..... | --- | 0,05 mL |
| <i>Volumen agua de mar sintética -Control-</i> | 4 mL | 4 mL |
| V inóc. microalgas concentrado..... | 0,1 mL | 0,1 mL |
| V disolución de nutrientes..... | --- | 0,05 mL |

Cada muestra se realizó por duplicado, y cada control por cuatriplicado.

Los viales se dispusieron en gradillas y se mantuvieron en la cámara incubadora durante un periodo de 10 días. Durante los primeros 5 días (0 a 4-d) se realizaron mediciones de la biomasa de los viales mediante medidas de turbidez a 690 nm. Entre los 5 y 10 días se realizaron mediciones en días alternos y finalmente, se midió a los 10 días de ensayo.

3.1.3.2.3.5. Tratamiento de datos y resultados. Cálculo de la inhibición/estimulación del crecimiento microalgal

El cálculo de la inhibición o estimulación del crecimiento de las poblaciones de microalgas marinas se realiza de la siguiente forma (Lewis *et al.*, 1994):

$$\% \text{Inhibición} = \frac{C - T}{C} \cdot 100; \quad \% \text{Estimulación} = \frac{T - C}{C} \cdot 100$$

Donde *C* es la biomasa del control medida como turbidez (690 nm) y *T* es la biomasa de cada tratamiento o muestra medida como turbidez (690 nm).

Con la fórmula de inhibición, valores significativamente mayores del control indican una respuesta tóxica de la muestra. Con la fórmula de estimulación, valores significativamente mayores que el control indican un efecto de enriquecimiento degradante de las muestras (Lewis *et al.*, 1994)

Cálculo del Índice de Eutrofización, I_E

El índice de eutrofización que se propone viene definido por la fórmula:

$$I_{Ei} = \frac{\text{Biomass (turbidity, 690nm) Ensayo sin nutrientes}}{\text{Biomass (turbidity, 690nm) Ensayo con nutrientes}}; \quad I_{Eglobal} = \frac{\sum_{i=1}^j I_{Ei}}{j}$$

(*i*=cada microalgae; *j*=número total de microalgas)

3.2. PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO CON ARTEMIA

Actualmente no se tienen referencias acerca de algún protocolo normalizado de toxicidad para este organismo, aunque existe un Instituto de la *Artemia* en Bélgica (*Artemia Reference Center, State University of Ghent and Laboratory of Biological Research in Aquatic Pollution, State of Ghent, Belgium*) el cual ha comercializado y por tanto ha establecido unas pautas de ensayo.

Basándonos en las recomendaciones dadas por el Instituto de la *Artemia* así como los protocolos de toxicidad aguda y crónica para crustáceos en agua dulce, se ha desarrollado un procedimiento de toxicidad el cual se resume a continuación.

3.2.1. INCUBACIÓN DE LOS QUISTES Y RECOLECCIÓN DE LOS NAUPLIOS

Los quistes deben ser incubados siempre en idénticas, estrictas y controladas condiciones. Para cada ensayo, se resuspendieron 100 mg de quistes en 100 mL de agua de mar sintética en un erlenmeyer de vidrio borosilicatado de 250 mL. Éste se mantuvo a 20 ± 1 °C en presencia de luz (11000 lux) y con aireación mediante un compresor y un difusor poroso cerámico situado en el fondo del recipiente.

Al cabo de 24 horas se recogen los nauplios eclosionados de 6 a 12 horas de edad. Para ello se detuvo la aireación y se dejó reposar el cultivo durante unos segundos. Los quistes vacíos, defectuosos y sin eclosionar quedan en la superficie permitiendo la recogida de los nauplios eclosionados los cuales se colocaron en otro erlenmeyer con agua de mar sintética. Mediante este transvase de los nauplios nos aseguramos un stock de nauplios en *estadio I* de la misma cohorte.

3.2.2. PREPARACIÓN DEL ENSAYO

Los experimentos se realizaron en placas petri de vidrio borosilicatado (diámetro 60 mm, altura 12 mm) para facilitar la observación de los organismos con una lupa binocular (URA Technic Serie 200).

En cada placa petri se transfirieron 10 individuos mediante una pipeta Pasteur. Al realizar este transvase es inevitable añadir una pequeña cantidad de agua de mar sintética. Para evitar que este volumen sea excesivo se ha procurado que el volumen dispuesto no supere los 0,05 mL.

Las placas se rellenaron entonces con 15 a 20 mL de la concentración del tóxico a ensayar. Se cerraron las placas y se colocaron en oscuridad en una cámara de incubación (temperatura de 20 ± 1 °C) durante el periodo de ensayo. Al colocarlos en oscuridad las artemias disminuyen su natación y por tanto consumen menos energía.

Al cabo de 24, 48, 72 y 96 horas se cuentan, con ayuda del microscopio, el número de individuos muertos (inmóviles durante 30 segundos), vivos con natación normal y aquellos que tienen alguna anomalía en las capacidades natatorias (natación en círculos, movimientos asincrónicos, etc.). Cabe destacar que, en nuestro caso, en estos conteos no se limitó el conteo a los organismos vivos y/o muertos, para luego por diferencia con el total obtener el dato contrario, ya que induciría a errores en los resultados, dado que se partiría de la premisa de que en todas las placas había originariamente 10 individuos, lo cual puede no ser así por errores cometidos en la preparación de las mismas.

La siguiente figura muestra el material utilizado en los ensayos de toxicidad de *Artemia*.

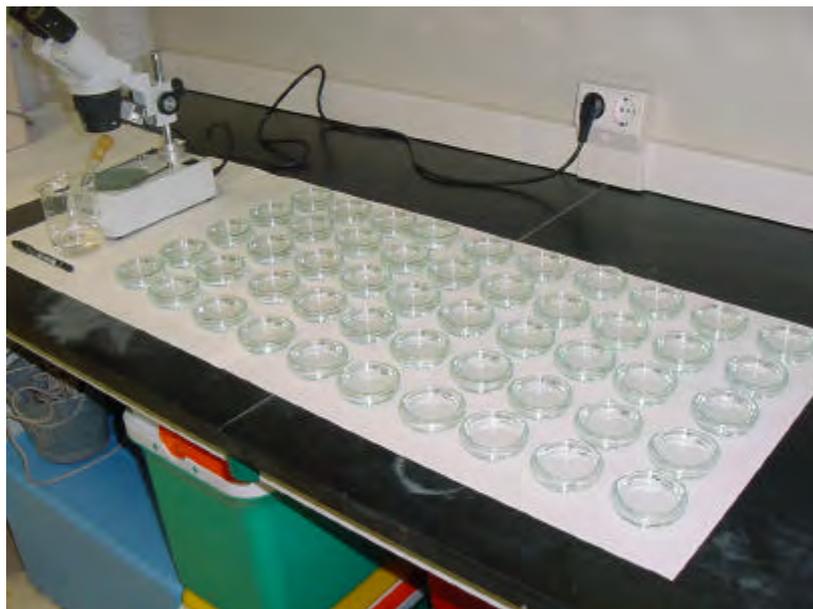


Figura CIII. 9. Material utilizado en los ensayos de toxicidad de *Artemia*

3.2.3. STOCK DE QUISTES DE ARTEMIA

Para la realización de los ensayos de toxicidad se emplearon quistes procedentes del Instituto de la *Artemia*, Bélgica, proporcionados a través del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (ICMAN-CSIC). Concretamente la cepa empleada ha sido la *Artemia franciscana* (Vietnam, código1309).



Figura C III.10.
Nauplio de *Artemia*

3.2.4. TRATAMIENTO DE DATOS Y RESULTADOS

Los parámetros que se pretenden calcular con el presente ensayo son los valores de la LC_{50} (concentración que provoca un 50% de mortalidad), el NOEL (concentración más alta que no provoca mortalidad) y el LOEL, (la concentración más baja que provoca una mortalidad del 10%).

La LC_{50} se determina formalmente, mediante alguno de los métodos que se enumeran a continuación: *Método Gráfico*, *Método de Spearman-Kärber*, *Método de Trimmed Spearman-Kärber*, y *Método Probit*.

Los efectos umbrales, NOEC y LOEC se determinan mediante contraste de hipótesis siguiendo el procedimiento descrito en el apartado que describe estos métodos para algas.

Para la determinación de la LC_{50} el criterio de selección de un método u otro, se refleja en el diagrama de flujo de la siguiente figura.

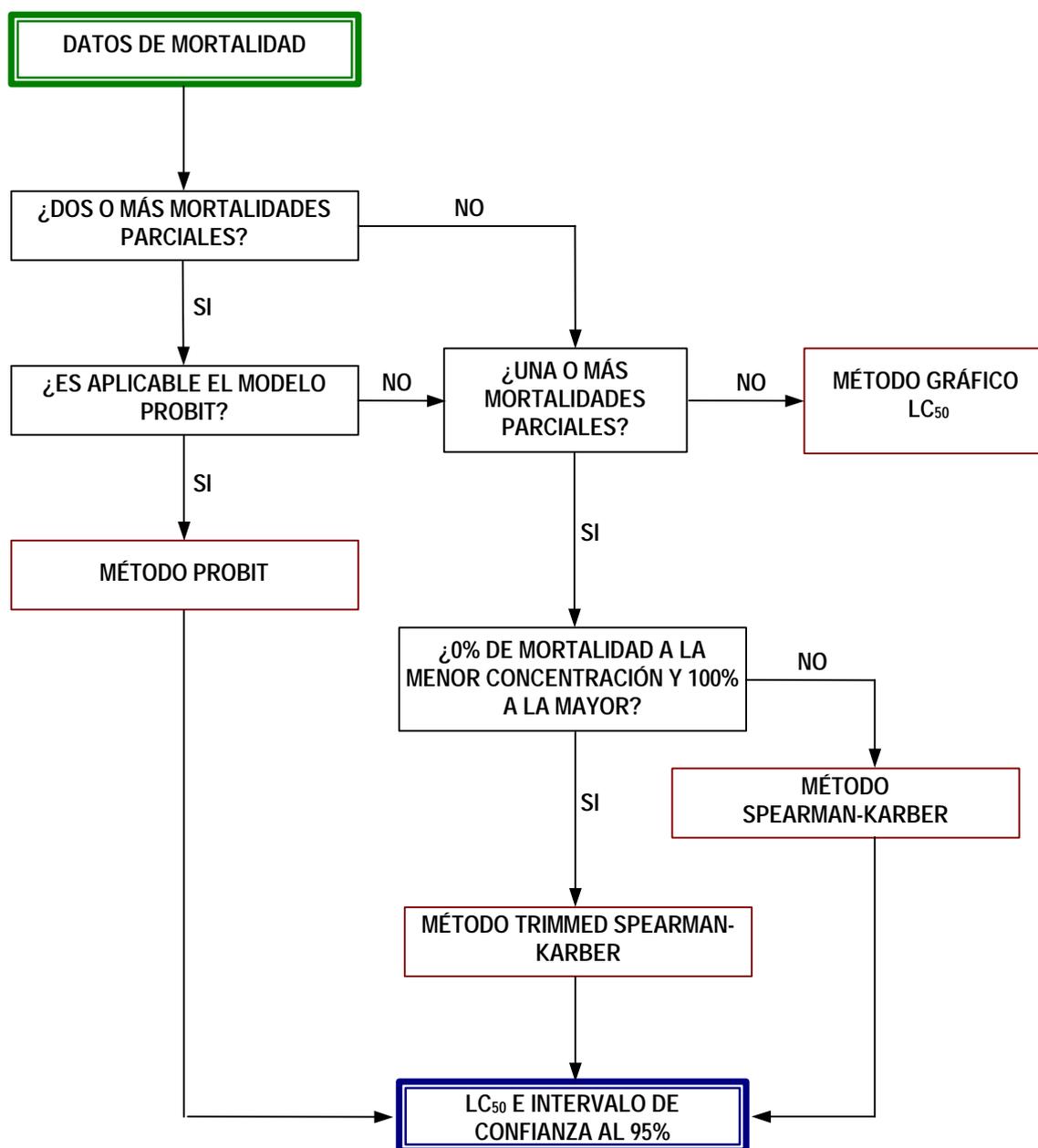


FIGURA C III.11.

Esquema representativo del procedimiento seguido para el tratamiento de los datos obtenidos en los ensayos de toxicidad con *Artemia salina*.

3.2.4.1. MÉTODO PROBIT PARA LA DETERMINACIÓN DE LA LC₅₀

Si bien se han nombrado cuatro métodos de determinación de la LC₅₀ en función de los resultados obtenidos y de las características del ensayo, el método más formal es el método Probit (Finney, 1971), puesto que determina la LC₅₀ a partir de un procedimiento iterativo, y además realiza una estimación de los intervalos de confianza asociados a la LC₅₀. Una completa descripción de los otros métodos se puede consultar en Lewis (Lewis *et al*, 1994).

El método Probit es un procedimiento estadístico paramétrico el cual determina la LC₅₀ y el 95% del intervalo de confianza (Finney, 1971). El análisis consiste en transformar los porcentajes de mortalidad observados mediante una transformación Probit y cambiar las concentraciones de efluentes o tóxicos aplicando el log₁₀. Asumiendo la normalidad para el log₁₀ de la respuesta, se observa que existe una relación lineal entre las variables transformadas mencionadas anteriormente. Esta relación permite estimar los parámetros de la regresión lineal utilizando una aproximación iterativa. La LC₅₀ estimada y el intervalo de confianza asociado se calculan a partir de los parámetros de la regresión lineal.

Los requisitos necesarios para poder aplicar el método Probit son los siguientes:

- ☑ Para obtener una estimación precisa de la LC₅₀ mediante el método Probit, los porcentajes de mortalidad observados deben comprender el 0,5.
- ☑ Se asume que el log₁₀ de la tolerancia sigue una distribución normal.
- ☑ Para calcular la LC₅₀ y el 95% del intervalo de confianza, al menos dos de los porcentajes de mortalidad observados deben estar entre 0 y 100.

La distribución normal puede expresarse de la siguiente forma:

$$dP = \frac{e^{-\frac{(x-m)^2}{2 \cdot s^2}}}{s \cdot \sqrt{2 \cdot p}} \cdot dx \quad \text{para todos los valores de } x \text{ en el rango } (-\infty, +\infty).$$

En nuestro contexto dP representa la fracción de organismos que responden a la concentración cuyo logaritmo comprende desde x hasta $x+dx$.

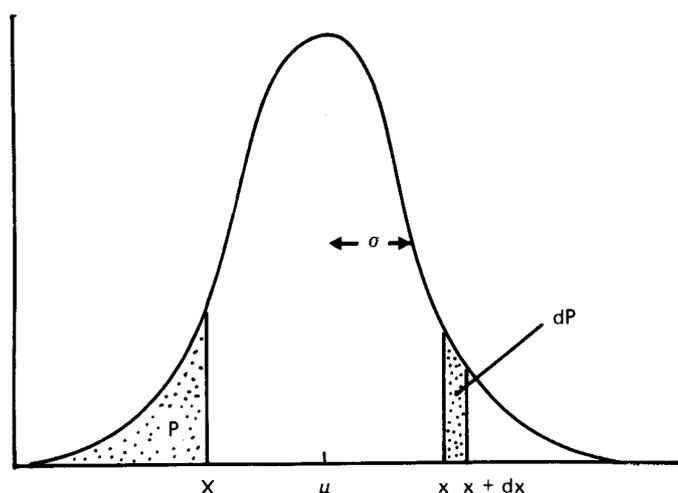


Figura C III.12.

Función de frecuencia, para una variable distribuida normal y aleatoriamente, con un valor medio μ y una desviación σ .

El área sombreada representa el porcentaje infinitesimal dP de organismos que responden cuando el $\log_{10} c$ se encuentra entre x y $x+dx$. El área sombreada P es igual a la fracción de organismos que responden cuando el $\log_{10} c$ es menor que X .

El área total bajo esta curva es igual a 1, lo que quiere decir que todos los organismos responderán cuando la concentración varíe desde 0 ($x = \log_{10} (0) = -\infty$) hasta la más alta concentración ($x = +\infty$).

Debido al gran número de cálculos que hay que realizar para estimar el valor de la LC_{50} y su intervalo de confianza mediante el método Probit, los datos se analizaron con la ayuda de un programa de ordenador. Concretamente se ha usado el programa "*EPA Probit Analysis Program*" diseñado para el cálculo de valores de LC y EC, Versión 1.5. (Lewis *et al.*, 1994).

3.3. PROCEDIMIENTOS DE ENSAYO CON BACTERIAS MARINAS

3.3.1. INSTRUMENTACIÓN

El analizador de toxicidad LUMISTOX consta, a grandes rasgos, de un bloque de incubación de cubetas que contienen la muestra y las bacterias luminiscentes, y de un fotomultiplicador que realiza la medida de la intensidad de la luz emitida por las distintas soluciones. Con los resultados de estas medidas se calcula la función *Gamma* que es la relación entre la intensidad de luz perdida por la acción tóxica y la intensidad de luz remanente, corregidas por un factor de corrección que expresa la disminución de luz de un blanco. La relación entre los logaritmos de la función Gamma (Γ) y de la concentración de la muestra es lineal, lo que permite calcular fácilmente el valor de CE₅₀ para el cual Γ es igual a 1, es decir, la luminiscencia se ha reducido al 50%.



Vibrio fischeri



Bloque de incubación (izda.) y fotomultiplicador (dcha.)
Sistema LUMISTOX

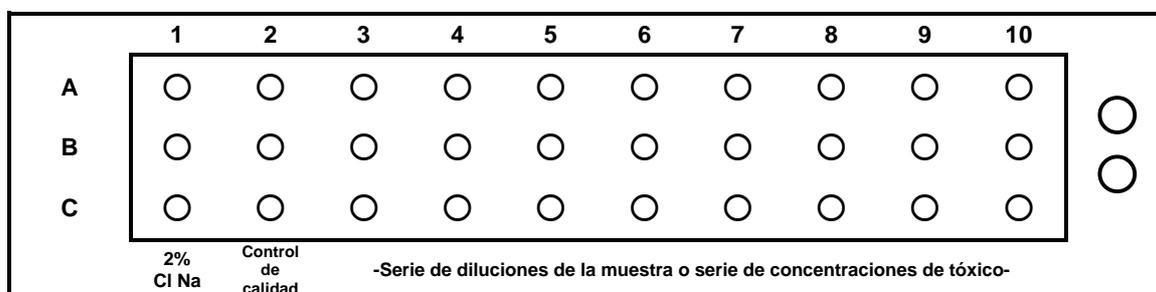


Figura C III.13. Sistema LUMISTOX. Bacterias luminiscentes, bloque de incubación, fotomultiplicador. Esquema de la disposición de cubetas en el bloque de incubación

FILA A, 10 cubetas para atemperar las soluciones de ensayo antes del ensayo
 FILA B, 10 cubetas para ensayar la toxicidad. Réplica I
 FILA C, 10 cubetas para ensayar la toxicidad. Réplica II

COLUMNA 1, Blanco del ensayo (CINa 2%)
 COLUMNA 2, Control de calidad del ensayo
 COLUMNA 3 a 10, disoluciones de ensayo

Las dos cubetas de mayor tamaño situadas a la derecha del esquema del bloque de incubación se utilizan para atemperar las bacterias y la solución reconstituyente en el periodo de reactivación

3.3.2. PRINCIPIO DEL MÉTODO

El ensayo de toxicidad empleado en este caso es la prueba con bacterias luminiscentes basado en la norma DIN 38412 L34.

El principio de este procedimiento consiste en determinar la toxicidad utilizando bacterias luminiscentes liofilizadas. Para ello, reconstituyen las bacterias, se mide la emisión natural de luz de estos microorganismos y se determina la inhibición de la emisión en presencia de varias concentraciones de tóxico en comparación con un control. El parámetro determinado mediante este ensayo es la EC_p, concentración del compuesto que provoca una inhibición de la luminiscencia del p %.

3.3.3. DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

3.3.3.1. REACTIVACIÓN DE LAS BACTERIAS LUMINISCENTES

Las bacterias se suministran liofilizadas y conservadas mediante congelación en recipientes individuales cada uno de los cuales sólo se puede utilizar para una serie de ensayos. Junto con las bacterias, se proporcionan viales con una solución de reactivación (glucosa y ClNa tamponado a pH=7) (Dr. Bruno Lange GmbH, Prod nº LCK480).

El procedimiento de reactivación consiste en primer lugar, en descongelar la solución de reactivación a temperatura ambiente, e introducirla en el termostato (Dr. Bruno Lange GmbH, Prod nº LUMISTherm) para mantenerla a 15 °C.

El vial de bacterias luminiscentes se descongela introduciéndolo en un recipiente con agua a temperatura ambiente durante dos minutos, justo antes de la reactivación. Transcurrido este tiempo, se resuspenden en 0,5 mL de solución de reactivación y se introducen en el termostato a 15°C durante 15 minutos.

Transcurridos los 15 minutos se mezclan las bacterias luminiscentes en suspensión con el resto de la solución de reactivación y se transfieren porciones de 0,5 mL a las cubetas de vidrio que previamente hemos situado en las diferentes cubetas del termostato (fila B y C) y se esperan un tiempo de 15 minutos para completar la reactivación.

3.3.3.2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Mientras se producía la reactivación de las bacterias luminiscentes se prepararon las muestras a las que se les va a medir la toxicidad.

Para cada ensayo, además de las muestras se incluyó un control (duplicado, posiciones B1 y C1 en el bloque de incubación) constituido únicamente por una solución de ClNa al 2%, así como una solución tóxica estándar (duplicado, posiciones B2 y C2 en el bloque de incubación), compuesta por una solución de ZnSO₄·7H₂O (Dr. Bruno Lange GmbH, Prod nº LCK482), para comprobar la calidad de los resultados. Esta solución estándar debe provocar al cabo de 30 minutos una inhibición de la bioluminiscencia de entre el 60 y el 40%.

Tres mililitros de todas las muestras de ensayo se introdujeron en las cubetas situadas en la fila A del termostato (15°C), y se mantuvieron en reposo durante 15 minutos antes de comenzar el ensayo.

3.3.3.3. REALIZACIÓN DEL ENSAYO

Una vez transcurridos los 15 minutos de reactivación completa, se midió la luminiscencia inicial de cada cubeta, e inmediatamente se añaden 0,5 mL de las soluciones a ensayar (fila A). Al cabo de los 15 y 30 minutos de incubación, se realizan de nuevo, lecturas de luminiscencia.

Tabla C III.11.

Modelo de hoja de datos empleada para recoger los resultados de intensidad de bioluminiscencia en ensayos de toxicidad con *Photobacterium phosphoreum*

| Lumistox | t = 0 | Luminiscencia | t = 15 | Luminiscencia | t = 30 | Luminiscencia | t=60 | Luminiscencia |
|----------|-------|---------------|--------|---------------|--------|---------------|------|---------------|
| A1 | B1 | 0,00 | | 15,00 | | 30,00 | | 0,00 |
| | C1 | 0,45 | | 15,45 | | 30,45 | | 0,45 |
| A2 | B9 | 1,30 | | 16,30 | | 31,30 | | 1,30 |
| | C9 | 2,15 | | 17,15 | | 32,15 | | 2,15 |
| A3 | B8 | 3,00 | | 18,00 | | 33,00 | | 3,00 |
| | C8 | 3,45 | | 18,45 | | 33,45 | | 3,45 |
| A4 | B7 | 4,30 | | 19,30 | | 34,30 | | 4,30 |
| | C7 | 5,15 | | 20,15 | | 35,15 | | 5,15 |
| A5 | B6 | 6,00 | | 21,00 | | 36,00 | | 6,00 |
| | C6 | 6,45 | | 21,45 | | 36,45 | | 6,45 |
| A6 | B5 | 7,30 | | 22,30 | | 37,30 | | 7,30 |
| | C5 | 8,15 | | 23,15 | | 38,15 | | 8,15 |
| A7 | B4 | 9,00 | | 24,00 | | 39,00 | | 9,00 |
| | C4 | 9,45 | | 24,45 | | 39,45 | | 9,45 |
| A8 | B3 | 10,30 | | 25,30 | | 40,30 | | 10,30 |
| | C3 | 11,15 | | 26,15 | | 41,15 | | 11,15 |
| A9 | B2 | 12,00 | | 27,00 | | 42,00 | | 12,00 |
| | C2 | 12,45 | | 27,45 | | 42,45 | | 12,45 |
| A10 | B1 | 13,30 | | 28,30 | | 43,30 | | 13,30 |
| | C1 | 14,15 | | 29,15 | | 44,15 | | 14,15 |

3.3.3.4. TRATAMIENTO DE LOS RESULTADOS

Al finalizar las mediciones se tiene de cada preparación es decir, tanto de las muestras con diferentes concentraciones de tóxico (B3 - B10, C3 - C10), el tóxico de referencia (estándar) (B2, C2), como del control (B1, C1), dos pares de valores de medición, el valor para t = 0 (I_0) y el valor final, t = 15 y 30 min.

A partir del valor de I_0 e I_t obtenidos del control, se determina la disminución de la intensidad de la luminosidad durante el período t de incubación sin influencia alguna de agentes tóxicos:

$$FC = \frac{I_t}{I_0}$$

Esto significa que si no se hubiera añadido una sustancia perjudicial, la luminosidad de las mezclas de ensayo hubiera caído hasta el (FC·100) % del valor I_0 . Se determinarán los valores del factor de corrección (FC) correspondientes a las dos réplicas del control (B1 y C1), y se emplea el valor medio. Dicho valor ha de estar comprendido entre 0,6 y 1,8.

Los valores de I_0 de las mezclas de ensayo se multiplican por el FC . El resultado son los valores de $I_{correl.t}$ de las mezclas de ensayo; es decir, las intensidades de luminosidad teóricas de las mezclas de ensayo después de un tiempo de incubación de t minutos, sin que la muestra haya sido afectada por agente tóxico alguno.

$$I_{correl.t} = I_0 \cdot FC$$

A partir de $I_{correl.t}$ e I_t se calcula el porcentaje de inhibición ($\%H_t$) de las mezclas de ensayo durante el tiempo de incubación t .

$$\%H_t = \frac{I_{correl.t} - I_t}{I_{correl.t}}$$

Para dar linealidad a la curva de inhibición de luminosidad en función de la concentración de tóxico ensayada, y de esta forma facilitar por medio del gráfico la lectura del valor EC_{50} , se convierten los valores del porcentaje de inhibición ($\%H_t$) en valores $gamma$ (γ):

$$\tilde{a}_t = \frac{\%H_t}{100 - \%H_t}$$

Por último, para la representación gráfica de la relación dosis-efecto de la muestra, se utiliza papel doble logarítmico. El eje de abscisas corresponde al rango de los valores $gamma$, de 0,01 a 10. El eje de las ordenadas se corresponde con las concentraciones del tóxico ensayado. En este gráfico se registran los valores $gamma$ de los resultados y se unen con las perpendiculares óptimas. Al menos tres de los valores de $\%H_t$ deben encontrarse entre el 10 y el 90% de inhibición, pues en caso contrario la curva resultante no sería fiable. La concentración de tóxico a la que la luminosidad se inhibe en un 50% viene dada por el punto de intersección de las perpendiculares con las paralelas sobre el eje de ordenadas para $gamma = 1$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Debido al número de especies ensayadas, las medidas realizadas y la importancia y complejidad de los análisis estadísticos de estos ensayos, se han incluido en anexos independientes, los cálculos pormenorizados realizados para la obtención de los resultados que aquí se presentan y discuten.

El presente apartado se ha distribuido de la siguiente forma:

- Primeramente se mostrarán los resultados de los ensayos de toxicidad estándar de diferentes compuestos individuales empleando para ello diferentes especies marinas. Estos compuestos son el tensioactivo aniónico *LAS*, el tensioactivo no-iónico *NP9EO*, *fenol*, *lindano*, *cobre*, *cadmio* y *zinc*.
- Para el tensioactivo aniónico *LAS*, además de los ensayos de toxicidad estándar se han realizado también ensayos de toxicidad usando aguas procedentes de las diferentes áreas de estudio como agua de dilución.
- En el segundo apartado se mostrarán los resultados obtenidos en el ensayo de aguas receptoras con microalgas marinas.
- Finalmente, se expondrán las conclusiones obtenidas en los diferentes estudios.

4.1. ENSAYOS DE TOXICIDAD DE COMPUESTOS ESPECÍFICOS

En este apartado se exponen los resultados de los ensayos de toxicidad realizados en condiciones controladas de temperatura, iluminación, composición del medio nutriente, y composición del agua de dilución. En los anexos correspondientes a cada compuesto se detallan estas condiciones experimentales.

Antes de comenzar con el análisis de los resultados, es preciso comentar que debido al gran volumen de información obtenida en cada ensayo, realizar un análisis pormenorizado de cada compuesto resultaría innecesariamente extenso y laborioso. Por ello, la intención ha sido exponer de forma detallada el análisis completo del primer compuesto ensayado (*LAS*), y realizar una simplificación en el análisis del resto de compuestos.

4.1.1 TOXICIDAD DEL TENSIOACTIVO ANIÓNICO LAS

4.1.1.1. ENSAYOS CON MICROALGAS MARINAS

Antes de realizar el ensayo definitivo de toxicidad, se llevó a cabo un ensayo preliminar al objeto de determinar el rango de concentraciones en el cual es posible observar desde efectos umbrales de toxicidad hasta efectos superiores al 95% de inhibición del crecimiento. Los resultados de este ensayo preeliminar mostraron que se producía un importante descenso de la velocidad de crecimiento en el rango de 1 a 10 mg/L de LAS para las algas *N. gaditana*, *I. galbana*, *D. salina* y *C. gracilis*. Para la especie *T. chuii*, este rango de concentraciones de efecto se situó entre 2 y 20 mg/L. A partir de estos resultados, se seleccionaron las 10 concentraciones utilizadas en el ensayo definitivo:

| Especies | Concentración de LAS (mg/L) | | | | | | | | | | |
|---------------------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|
| <i>T. chuii</i> | 0,0 | 2,0 | 4,0 | 6,0 | 8,0 | 10,0 | 12,0 | 14,0 | 16,0 | 18,0 | 20,0 |
| Resto de microalgas | 0,0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 6,0 | 7,0 | 8,0 | 9,0 | 10,0 |

El método de inoculación, las medidas de crecimiento y los métodos de análisis de resultados fueron los descritos en el apartado 3.1.3.2.2 del presente capítulo.

Al comienzo del ensayo, y cada 24 horas de exposición, se estimó la concentración de biomasa mediante determinaciones de turbidez (690 nm) de cada uno de los tratamientos. Una vez terminado el ensayo, estas medidas se normalizaron de la siguiente forma:

$$\text{Biomasa normalizada (Abs')} = \text{Abs}(t) - \text{Abs}(t=0)$$

Siendo Abs (t) la turbidez obtenida al cabo de "t" horas de exposición, y Abs (t=0) la turbidez obtenida al comienzo del ensayo.

Como veremos mas adelante, en ocasiones se obtienen valores de biomasa normalizada negativos. Esto se produce cuando existe una disminución de la turbidez del cultivo respecto al valor obtenido en el momento inicial del ensayo. Esta disminución de turbidez es indicativa de un descenso en el número de células de la población de microalgas, y por tanto, procesos de muerte y desaparición celular. Las microalgas ensayadas presentan un población microbiana asociada la cual ha sido descrita y comentada por diversos autores (González del Valle, 1997; Moreno Garrido, 1997). Sin entrar en la discusión de si estas bacterias afectan al crecimiento de las microalgas en un sentido u otro, no hay que olvidar que son organismos degradadores, y por lo tanto, puede que sean las responsables de la disminución de la turbidez al eliminar un porcentaje de las microalgas muertas.

En la figura C III.14., se muestra la evolución temporal de la concentración de biomasa normalizada.

Los puntos representan los valores promedios de los replicados de cada concentración. Las barras de error muestran la desviación estándar de los replicados.

Cada línea de color representa la curva de crecimiento de cada concentración a lo largo del periodo de ensayo. En el Anexo II se puede observar que el periodo de incubación se prolongó hasta 10 días de duración para uno de los replicados de cada concentración, al objeto de obtener información adicional para un periodo de exposición crónica.

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo

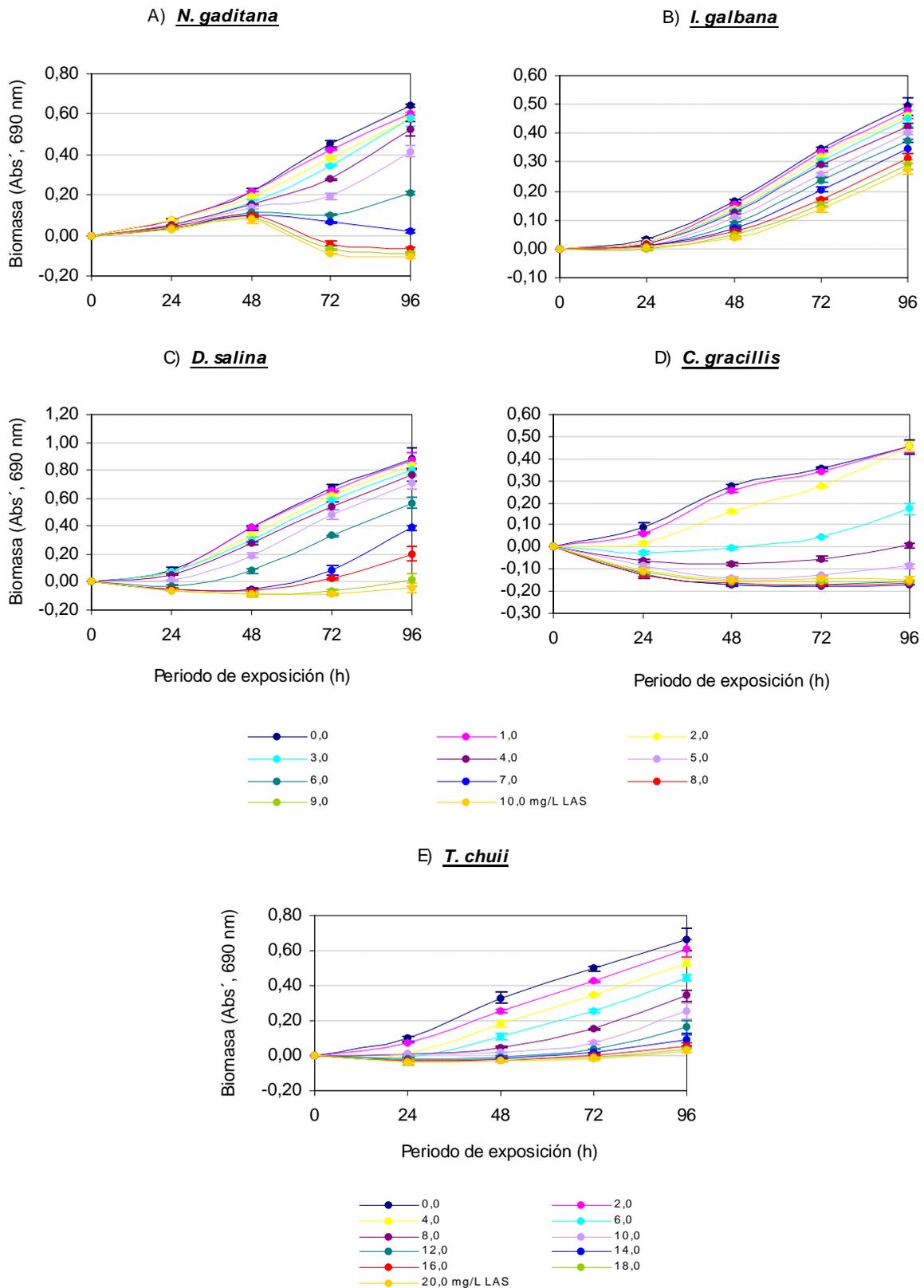


Figura C III.14. Evolución de la concentración de biomasa normalizada en el ensayo de toxicidad del LAS y microalgas marinas

En dicha figura podemos observar que el efecto que produce el tensioactivo no es el mismo en todos los organismos. Así tenemos microalgas como *I. galbana* la cual a concentraciones elevadas de exposición, no se produce una muerte significativa de la población obteniéndose valores positivos de biomasa normalizada. Por otra parte, para *C. gracilis* sí se produce la muerte de un porcentaje importante de la población a concentraciones por encima de 4 mg/L. Casos intermedios lo representan los resultados obtenidos con las microalgas *N. gaditana*, *D. salina* y *T. chuii*. Para *N. gaditana*, a concentraciones elevadas de LAS se produce un ligero aumento de la población durante las primeras horas de ensayo, pero transcurridas 48 horas de exposición, la concentración de biomasa comienza a decrecer. Para las microalgas *D. salina* y *T. chuii* el efecto es contrario, esto es, después de un periodo inicial durante el cual la velocidad de crecimiento es mínima e incluso negativa, el organismo se aclimata y comienza a multiplicarse. Estos comportamientos han sido ampliamente descritos y modelizados por Kooijman y Bedaux (1996) denominándolos modelos de daño y adaptación respectivamente.

En la figura C III.15. se muestra la variación de la concentración de biomasa normalizada en el rango de concentraciones de ensayo para cada periodo de exposición.

Una descripción exhaustiva de las diferentes formas que toman las curvas dosis-respuesta en ensayos con algas puede consultarse en Rand (Rand, 1995). Pero sin duda, la forma más habitual y la cual se toma como ejemplo en diversos manuales y documentos relativos a procedimientos de toxicidad es la curva sigmoideal. En las curvas sigmoideales, y en general en todas las curvas dosis-respuesta, hay que tener en cuenta fundamentalmente la forma que toman los extremos de las curvas y la pendiente. Para los ensayos de inhibición del crecimiento, el extremo superior incluye a todas aquellas concentraciones que presentan una velocidad de crecimiento -y por tanto una concentración de biomasa- similar a la población control. El extremo inferior incluye a las concentraciones de tóxico que inhiben completamente el crecimiento de la población de algas. En estas concentraciones, la velocidad de crecimiento es prácticamente nula y los valores de biomasa similares a los iniciales. La pendiente de la curva incluye a las concentraciones que ejercen un efecto inhibitorio parcial a las poblaciones de microalgas provocando un descenso en la velocidad de crecimiento y por tanto una disminución en los valores de biomasa de la población respecto al control. En este tramo, a mayor concentración de tóxico, mayor es el retardo en el crecimiento y menor es la concentración de biomasa.

El extremo superior puede adquirir una forma horizontal o ligeramente curvada. Esta curva podrá ser descendente cuando los tratamientos correspondientes a bajas concentraciones estén ligeramente inhibidos, y será ascendente en aquellos tratamientos en los que el compuesto de ensayo cause una estimulación en el crecimiento de la población (Rand, 1995). Para el ensayo del LAS, no se observa estimulación del crecimiento a las concentraciones ensayadas. Para las microalgas *N. gaditana*, *D. salina*, *C. gracilis* y *T. chuii* se observa un rango de concentraciones de tensioactivo las cuales causan un efecto inhibitorio muy bajo o casi nulo, hasta una determinada concentración a partir de la cual el efecto es más acusado. Esta concentración límite a partir de la cual se produce el umbral de efecto no es la misma para todas las microalgas, más aun, para una microalga específica el umbral de efecto puede variar en función del tiempo de exposición. Para el periodo máximo de exposición mostrado en las figuras (96 horas), estas concentraciones límites están en torno a 2 mg/L para *C. gracilis*, 4 mg/L para *N. gaditana* y *T. chuii*, y 5 mg/L para *D. salina*. En el caso de *I. galbana* no se aprecia este "salto" en la concentración de biomasa sino que en el rango de concentraciones de tensioactivo ensayado, se produce un descenso gradual en la concentración de biomasa a medida que aumenta la concentración de tensioactivo.

Otro aspecto interesante que se observa en estas gráficas, es la magnitud o intensidad con que la biomasa desciende a medida que aumenta la concentración del tensioactivo, aspecto éste relacionado con la pendiente de las curvas. Se puede apreciar comportamientos diferentes. Así, se puede observar microalgas como *I. galbana* que presentan una magnitud del efecto muy poco acusado (curvas de baja pendiente), mientras que en el otro extremo nos encontramos con el caso de *C. gracilis* donde se observa un gran descenso de la concentración de biomasa a medida que aumenta la concentración de

tensioactivo y por tanto, una elevada pendiente. Las siguientes microalgas que presentan alta pendiente serían en orden decreciente, *N. gaditana*, *D. salina* y *T. chuii*.

Llegado a este punto, sería necesario hacer hincapié, en el hecho de que una elevada pendiente no implica necesariamente que el microalga sea más sensible, pues este aspecto está más relacionado con la citada concentración "límite" en la que el alga comienza a manifestar efecto. La pendiente viene a indicar que una vez que el efecto se ha manifestado, a qué velocidad actúa el tensioactivo. Es por tanto, un aspecto que está relacionado con el concepto de toxicocinética más que con la sensibilidad (Rand, 1995; Perales 2000).

En el tramo inferior de la curva se encuentran los valores de biomasa de aquellas concentraciones de tensioactivo que causan una gran inhibición en el alga. Este extremo puede tomar forma horizontal o ligeramente curvada.

Los tramos horizontales se obtienen cuando desde el comienzo del ensayo, ciertas concentraciones de tóxico ejercen un efecto inhibitorio completo en las poblaciones de algas, el crecimiento es prácticamente nulo, y los valores de biomasa similares a los valores iniciales. Este sería el caso de las microalgas *T. chuii* y *C. gracilis* en cuyas gráficas vemos como el extremo final de las curvas es lineal y coincide prácticamente para los diferentes periodos de exposición. Si bien en el caso de *T. chuii* el extremo inferior se mantiene en valores próximos a los iniciales (inhibición del crecimiento), en el caso del microalga *C. gracilis* este extremo muestra valores negativos de biomasa normalizada, es decir, no sólo se ha producido una inhibición del crecimiento, sino que también ha tenido lugar un descenso o muerte de la población respecto a los valores iniciales.

Cuando el extremo inferior adquiere una curvatura descendente, indica diferentes grados de inhibición en este nivel de efecto. Estas formas no se observan claramente en el ensayo del LAS pero sí podrá observarse en los ensayos con otros compuestos.

Las representaciones gráficas mostradas en las figuras C III.14 y C III.15 nos permiten determinar visualmente si el rango de concentraciones seleccionado es adecuado para la obtención de las diferentes concentraciones de efecto.

En general, en el ensayo del LAS se han observado una amplia gama de curvas con diferentes velocidades de crecimiento, y se han identificado curvas con formas sigmoidales en las curvas dosis respuesta. Por lo tanto, y a la espera de los resultados obtenidos mediante las diferentes técnicas estadísticas, puede decirse que los rangos de concentraciones de ensayo son adecuados.

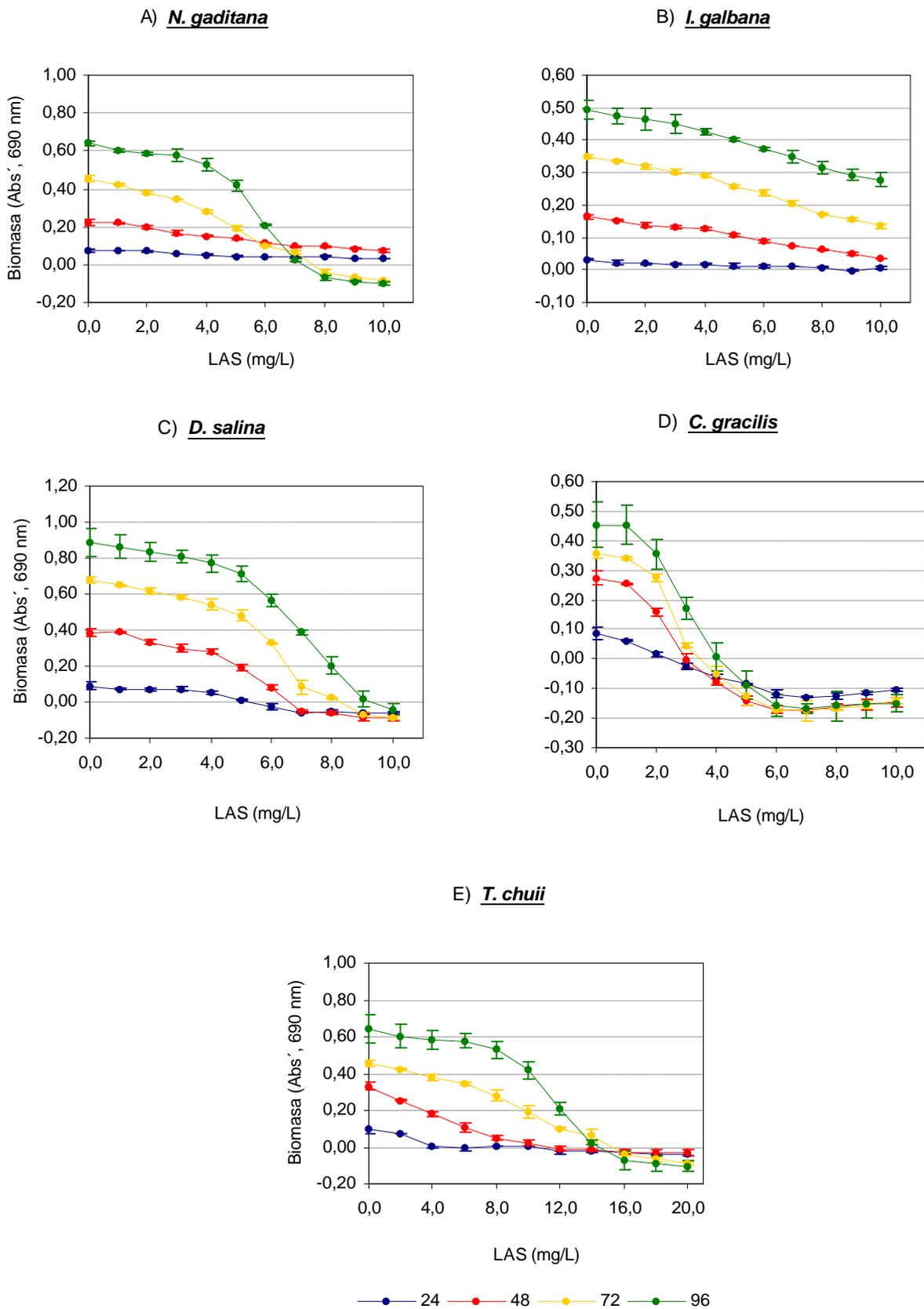


Figura C III.15. Variación de la concentración de biomasa normalizada con la concentración de LAS

Una vez vista la evolución del ensayo, se procedió a realizar el análisis de datos según el diagrama de flujo mostrado en el apartado 3.1.3.2.2.3. El análisis de datos tanto para la obtención de los efectos umbrales como para la obtención de los IC_p, se realizó a partir de los valores normalizados de biomasa (Abs⁻¹).

Antes de comenzar con la exposición de las diferentes pruebas estadísticas es necesario realizar una breve reflexión sobre los periodos de exposición. Son muy pocos los autores que consideran las respuestas obtenidas en periodos inferiores a 48 horas en los ensayos con microalgas. Esto se debe a que estas primeras horas son críticas en el ensayo. La manipulación, los procedimientos de concentración de los cultivos madres para la obtención del inóculo de ensayo, la exposición a los tóxicos, etc., pueden generar estrés en las microalgas y producirse un retardo en las velocidades de crecimiento, y por tanto necesitan de un tiempo de adaptación y recuperación. Mediante el procedimiento de inoculación propuesto en la presente memoria (apartado 3.1.3.2.2) se consigue reducir en la mayoría de las ocasiones, el estrés que se genera por manipulación, obteniéndose respuestas diferenciadas para las diferentes concentraciones de ensayo incluso a las 24 horas de exposición, y bastante concluyentes a las 48 horas. Por ello, y como control de calidad de los resultados a lo largo de todo el ensayo, se ha comprobado las condiciones de normalidad de la distribución de resultados y homogeneidad de la varianza en todos los periodos de exposición obteniéndose el cumplimiento de ambas en prácticamente todos los ensayos realizados. Para el caso del LAS, y en general para todos los compuestos de ensayo, se mostrarán los resultados obtenidos en este "control de calidad", pero en relación con las concentraciones estimadas para cada nivel de efecto (concentraciones umbrales e IC_p), sólo se mostrarán las obtenidas a las 72 y 96 horas de exposición.

Otra cuestión a considerar a la hora de calcular las concentraciones umbrales es el hecho de que en el procedimiento de Dunnett se considera todo el rango de concentraciones (N=33) incluyendo aquellas que ejercen un 100% en la inhibición del crecimiento y muerte de la población. La introducción de estas concentraciones en el procedimiento de cálculo de los niveles umbrales, puede afectar el resultado final. Por ello, y dada la importancia bibliográfica que tienen las respuestas obtenidas en el periodo de 72 horas, se ha realizado un estudio estadístico adicional consistente en la comprobación de las condiciones de normalidad, homogeneidad y concentraciones umbrales, variando el número de concentraciones de tóxico en los análisis. Para ello, se han ido excluyendo progresivamente desde las concentraciones más elevadas hasta el número de concentraciones mínimo recomendado para estos análisis (5 concentraciones mas el control; 6 concentraciones x 3 replicados; N=18) (Lewis *et al.*, 1994; Rand, 1995). Los resultados quedan reflejados en los diferentes anexos, y sólo en los casos en los que se produzca un cambio en las concentraciones umbrales calculadas, se realizará un breve análisis.

OBTENCIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES

Para la obtención mediante métodos estadísticos de los efectos umbrales, el primer paso consiste en comprobar si los resultados en cada periodo de exposición cumplen la condición de normalidad. Para ello se ha utilizado el test de Shapiro Wilk. Seguidamente se comprueba la homogeneidad de la varianza de los triplicados mediante el test de Barlett. En el apartado 3.1.3.2.2.3.1. del presente capítulo se detallan los procedimientos de cálculo de ambas pruebas.

De la aplicación del test de Shapiro Wilk en cada periodo de exposición, se obtuvo el estadístico *W*, el cual se comparó con un *W crítico* específico para el tamaño de muestra de los ensayos. Los *W críticos* se encuentran tabulados y pueden consultarse en el Anexo XIII. La condición para la obtención de la normalidad es que el *W calculado* sea mayor que el *W crítico* para un nivel de confianza preestablecido (generalmente $\alpha=0,05$).

Para el ensayo de toxicidad con microalgas y LAS los resultados fueron los siguientes:

Tabla C III.12. *W* calculados del ensayo de LAS y microalgas marinas. Test de Shapiro Wilk

| Periodo de exposición | Test de Shapiro Wilk. <i>W</i> calculados | | | | | <i>W</i> crítico para N=33 y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|---|-----------------------------|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chunii</i> | |
| 24 h | 0,981 | 0,946 | 0,974 | 0,939 | 0,964 | 0,931 |
| 48 h | 0,960 | 0,975 | 0,945 | 0,972 | 0,973 | |
| 72 h | 0,941 | 0,971 | 0,947 | 0,972 | 0,977 | |
| 96 h | 0,957 | 0,970 | 0,909 | 0,974 | 0,960 | |
| | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad excepto para t=96 h | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | |

Como puede apreciarse en la tabla, todas las algas en todos los periodos de exposición cumplieron la condición de normalidad, excepto para el alga *D. salina* a t=96 h.

De la aplicación del test de Barlett se obtuvo el estadístico *B*, y se comparó con un *B* crítico específico para el tamaño de muestra de los ensayos (Anexo XIII). La condición para la obtención de la homogeneidad de la varianza es que el *B* calculado sea menor que el *B* crítico para un nivel de confianza preestablecido ($\alpha=0,05$). Los resultados fueron los siguientes:

Tabla C III.13. *B* calculados del ensayo de LAS y microalgas marinas. Test de Barlett

| Periodo de exposición | Test de Barlett. <i>B</i> calculados | | | | | <i>B</i> crítico para 10 grados de libertad y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|--------------------------------------|-------------------|------------------|--------------------|------------------|---|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chunii</i> | |
| 24 h | 13,18 | 8,38 | 14,56 | 17,23 | 13,31 | 18,31 |
| 48 h | 15,89 | 11,43 | 6,84 | 10,64 | 15,09 | |
| 72 h | 13,13 | 10,49 | 16,89 | 10,57 | 10,30 | |
| 96 h | 10,82 | 9,65 | 5,16 | 15,59 | 14,60 | |
| | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | |

Los resultados mostrados en la tabla indican que todas las algas y para todos los periodos de exposición cumplieron la condición de homogeneidad de la varianza.

Los resultados obtenidos en ambos test indican una distribución de respuestas adecuada para el cálculo de los efectos umbrales. El único caso anómalo ha sido el no cumplimiento de la condición de normalidad para *D. salina* a las 96 h. Para esta alga y en este periodo de exposición se seguirá el procedimiento de cálculo, pero se interpretarán los resultados con precaución.

Finalmente, se aplicó el test de Dunnet cuya descripción pormenorizada se incluye en el apartado 3.1.3.2.2.3.1.

En este procedimiento se realizan pruebas *t* individuales de cada concentración de ensayo con el control. Estas *t* calculadas se compararon con las *t* críticas para el tamaño de muestra del ensayo. El significado de estas *t* es el siguiente:

- Aquella concentración cuya *t* calculada fuese menor que la *t* crítica, presenta un crecimiento estadísticamente similar al control.
- Aquella concentración cuya *t* calculada sea mayor en valor absoluto a la *t* crítica, presenta un crecimiento estadísticamente diferente al de la población control. Si el signo de la *t* calculada es negativo, presenta un crecimiento mayor que el control, y si el signo de la *t* calculada es positivo, el crecimiento es menor que la población control.

Para el ensayo del LAS los resultados a las 72 y 96 horas de ensayos fueron los siguientes:

Tabla C III.14. *t* calculados del ensayo de LAS y microalgas marinas (t=72 h). Método de Dunnett

| Test de Dunnet. Valores de <i>t</i> -calculados | | | | | | | |
|---|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|----------|-----------------|---|
| mg/L LAS | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | mg/L LAS | <i>T. chuii</i> | <i>T</i> crítica para 22 grados de libertad y 10 concentraciones |
| 1,0 | 4,01 (*) | 2,28 | 1,84 | 4,64 (*) | 2,0 | 12,43 (*) | 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 2,0 | 10,16 | 5,60 (*) | 3,74 (*) | 23,12 | 4,0 | 25,42 | |
| 3,0 | 14,97 | 8,43 | 5,86 | 86,63 | 6,0 | 41,22 | |
| 4,0 | 24,39 | 10,65 | 8,61 | 114,02 | 8,0 | 58,32 | |
| 5,0 | 36,51 | 16,75 | 12,37 | 135,00 | 10,0 | 71,59 | |
| 6,0 | 49,28 | 20,56 | 22,03 | 147,81 | 12,0 | 77,95 | |
| 7,0 | 54,32 | 26,41 | 37,68 | 148,46 | 14,0 | 81,55 | |
| 8,0 | 68,91 | 32,57 | 41,57 | 146,24 | 16,0 | 83,63 | |
| 9,0 | 72,88 | 35,65 | 47,30 | 143,17 | 18,0 | 86,16 | |
| 10,0 | 75,49 | 39,59 | 48,55 | 139,09 | 20,0 | 87,23 | |

Tabla C III.15. *t* calculados del ensayo de LAS y microalgas marinas (t=96 h). Método de Dunnett

| Test de Dunnet. Valores de <i>t</i> -calculados | | | | | | | |
|---|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|----------|-----------------|---|
| mg/L LAS | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | mg/L LAS | <i>T. chuii</i> | <i>T</i> crítica para 22 grados de libertad y 10 concentraciones |
| 1,0 | 3,38 (*) | 1,00 | 0,53 | 0,06 | 2,0 | 1,79 | 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 2,0 | 5,25 | 1,67 | 1,32 | 6,32 (*) | 4,0 | 4,67 (*) | |
| 3,0 | 6,49 | 2,53 | 2,00 | 19,34 | 6,0 | 7,54 | |
| 4,0 | 10,89 | 3,90 (*) | 2,89 (*) | 33,01 | 8,0 | 11,35 | |
| 5,0 | 19,76 | 5,28 | 4,35 | 41,67 | 10,0 | 14,57 | |
| 6,0 | 39,19 | 6,93 | 8,03 | 49,09 | 12,0 | 17,81 | |
| 7,0 | 55,99 | 8,37 | 12,58 | 50,02 | 14,0 | 20,27 | |
| 8,0 | 64,35 | 10,31 | 17,21 | 49,13 | 16,0 | 21,37 | |
| 9,0 | 66,28 | 11,56 | 21,88 | 48,56 | 18,0 | 22,02 | |
| 10,0 | 67,34 | 12,44 | 23,36 | 48,08 | 20,0 | 22,47 | |

Las *t* se calculan comenzando con la concentración más baja ensayada. Para aquella concentración en la cual no se cumple la condición de $t_{calculada} < t_{crítica}$, se ha insertado un asterisco al lado del valor de *t* para indicar que los valores medios de ésta son estadísticamente diferentes a la población control. Por definición, esta concentración es la de efectos mínimos observados (LOEC), y por tanto, la concentración inmediatamente inferior se corresponde con la concentración de no-efectos observados (NOEC).

La siguiente tabla muestra un resumen de los resultados umbrales obtenidos:

Tabla C III.16. Valores NOEC y LOEC obtenidos en el ensayos del LAS y las microalgas marinas

| 72 h | Microalgas Marinas | | | | |
|------|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> |
| NOEC | <1,0 | 1,0 | 1,0 | <1,0 | <2,0 |
| LOEC | 1,0 | 2,0 | 2,0 | 1,0 | 2,0 |
| 96 h | Microalgas Marinas | | | | |
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> |
| NOEC | <1,0 | 3,0 | 3,0 | 1,0 | 1,0 |
| LOEC | 1,0 | 4,0 | 4,0 | 2,0 | 2,0 |

Los resultados mostrados en la tabla, indican que para *N. gaditana* y *C. gracilis* la LOEC experimental se establece en 1 mg/L, y puesto que no se ha ensayado una concentración menor, no es posible determinar la NOEC experimental. Para *T. chuii* tampoco es posible establecer la NOEC experimental puesto que la LOEC se fija en la menor concentración ensayada con este alga, esto es, 2 mg/L. Para *I. galbana* y *D. salina* la LOEC se corresponde con 2 mg/L, y por tanto la NOEC es de 1 mg/L.

El problema del cálculo de estos valores mediante este procedimiento es que al ser la *t calculada* la que define si una concentración presenta efecto o no efecto, en la mayoría de las ocasiones ocurre que las concentraciones "reales" de efectos mínimos se sobreestiman y por consiguiente, se subestiman las concentraciones de no-efecto. Un ejercicio práctico para ver esto es observar el valor de los *t calculados* que definen los umbrales de efecto. Por ejemplo, en el caso de *I. galbana* la *t calculada* que define a 2 mg/L como LOEC tienen un valor de 5,60 y la *t calculada* correspondiente a 1 mg/L es de 2,28. Para el tamaño del conjunto de datos (N=33) la *t crítica* es 2,64, y por tanto este valor está más próximo a la *t calculada* de 1 mg/L que a la *t calculada* de 2 mg/L. En el caso de este compuesto, tal vez no parezca importante este hecho, pero si estamos hablando de calcular los niveles de no-efecto de un contaminante y estamos definiendo que unas aguas receptoras en vez de 1 mg/L pueda tener 1,5 mg/L, se está hablando de cantidades importantes en los vertidos dado el poder de dilución del medio marino.

La situación descrita para *I. galbana* es similar a la que ocurre con *D. salina*. El caso de *N. gaditana*, *C. gracilis* y *T. chunii* es todavía más grave pues para estas algas no se puede determinar la concentración de no-efectos observados, siendo patente en estos resultados, la importancia que tiene la selección del rango de concentraciones de ensayo. Viendo los valores de las *t calculadas* para estas algas hay que resaltar el valor tan alto en *T. chunii* que indica de esta forma la sobreestimación que se está realizando para la LOEC.

Esta preocupación de que no se están seleccionando concentraciones umbrales adecuadas ha sido manifestada por varios autores (Hoekstra y Van Ewijk, 1992; Pack, 1993), pero cabe destacar la realizada por Bruijn y Van Leeuwen en una monografía dedicada al análisis de datos de toxicidad acuática publicada por Kooijman y Bedaux (1996) en la cual los autores realizan un análisis crítico sobre estas concentraciones umbrales para su aplicación en regulaciones ambientales. En este documento se indica la posibilidad de utilizar otras expresiones de toxicidad más representativas y no tan condicionadas al diseño del ensayo, como son las ECx que en el caso de las microalgas el efecto sería la inhibición del crecimiento expresado como ICp.

DETERMINACIÓN DE LAS IC_p

Para el cálculo de estos IC_p existen varios métodos de cálculo (OCDE, 1984, 1998; APHA *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1994; OPPTS, 1996). Uno de los métodos más sencillo y versátil para la obtención de las concentraciones de inhibición y los límites de confianza asociados, es el que realiza el programa de cálculo IC_pin (Inhibition Concentration Approach Versión 2.0; USEPA, 1993) basado en el procedimiento resumido en Lewis *et al.*, (1994). Este programa permite calcular de forma inmediata las concentraciones de inhibición y los intervalos de confianza para una amplia gama de porcentajes de respuestas. Otra de las ventajas que presenta es que, si bien el programa permite hacer una estimación simple de estas concentraciones mediante una interpolación lineal, el programa ejecuta al mismo tiempo una rutina de cálculo basado en el método *bootstrap* (estimación autosuficiente) (Efron, 1979; Efron y Tibshirani, 1986, 1993), mediante el cual se obtiene una estimación más exacta de los valores IC_p y de los intervalos de confianza asociados (apartado 3.1.3.2.2.3 del presente capítulo). En el análisis de datos mediante este programa, se ha fijado en 1000 el número de remuestreos o iteraciones, puesto que es el número máximo de remuestreos aconsejado (Norberg-King, 1993).

Los resultados de los valores medios de los IC_p calculados para cada una de las algas se muestra en la tabla siguiente. Una presentación más exhaustiva de los resultados (interpolación lineal simple, límites de confianza, desviación estándar), se recoge en el Anexo II del presente documento.

Tabla C III.17. *ICp* calculados en el ensayo de LAS y microalgas marinas

| t (h) | Expresión de toxicidad | Valores de <i>ICp</i> | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|------------------------|-----------------------|-------|------|-------------------|-------|------|------------------|-------|------|--------------------|-------|------|-----------------|-------|-------|
| | | <i>N. gaditana</i> | | | <i>I. galbana</i> | | | <i>D. salina</i> | | | <i>C. gracilis</i> | | | <i>T. chuii</i> | | |
| | | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES |
| 72 | IC ₅ | 0,21 | 0,82 | 1,58 | 0,62 | 1,30 | 2,02 | 0,22 | 1,20 | 2,44 | 0,80 | 1,01 | 1,13 | 0,49 | 0,68 | 0,94 |
| | IC ₂₅ | 2,50 | 3,08 | 3,44 | 4,55 | 4,90 | 5,32 | 3,67 | 4,58 | 5,59 | 1,99 | 2,03 | 2,07 | 2,77 | 3,32 | 3,83 |
| | IC ₅₀ | 4,37 | 4,60 | 4,90 | 7,72 | 7,94 | 8,24 | 5,80 | 5,94 | 6,07 | 2,39 | 2,42 | 2,45 | 5,75 | 6,10 | 6,40 |
| | IC ₇₅ | 5,74 | 5,86 | 5,99 | | (*) | | 6,49 | 6,66 | 6,87 | 2,80 | 2,81 | 2,83 | 8,42 | 8,72 | 9,09 |
| | IC ₉₅ | 7,58 | 7,65 | 7,71 | | | | 7,34 | 7,80 | 8,05 | 3,59 | 3,62 | 3,65 | 12,61 | 13,08 | 13,52 |
| 96 | IC ₅ | 0,47 | 0,88 | 1,63 | -0,79 | 1,65 | 5,04 | -0,98 | 1,68 | 5,54 | -0,02 | 1,14 | 1,32 | -0,25 | 1,50 | 4,20 |
| | IC ₂₅ | 1,97 | 3,17 | 6,55 | 4,32 | 6,12 | 8,08 | 5,22 | 5,29 | 6,01 | 1,67 | 2,06 | 2,24 | 2,43 | 4,81 | 6,96 |
| | IC ₅₀ | 0,27 | 5,36 | 5,58 | | (*) | | 6,27 | 6,67 | 7,03 | 2,45 | 2,69 | 2,94 | 6,83 | 8,22 | 9,89 |
| | IC ₇₅ | 6,19 | 6,26 | 6,31 | | | | 7,46 | 7,90 | 8,36 | 3,07 | 3,34 | 3,54 | 10,54 | 11,90 | 13,67 |
| | IC ₉₅ | 6,88 | 6,95 | 7,04 | | | | 8,61 | 8,89 | 9,29 | 3,80 | 3,90 | 4,01 | (**) | 19,10 | (**) |

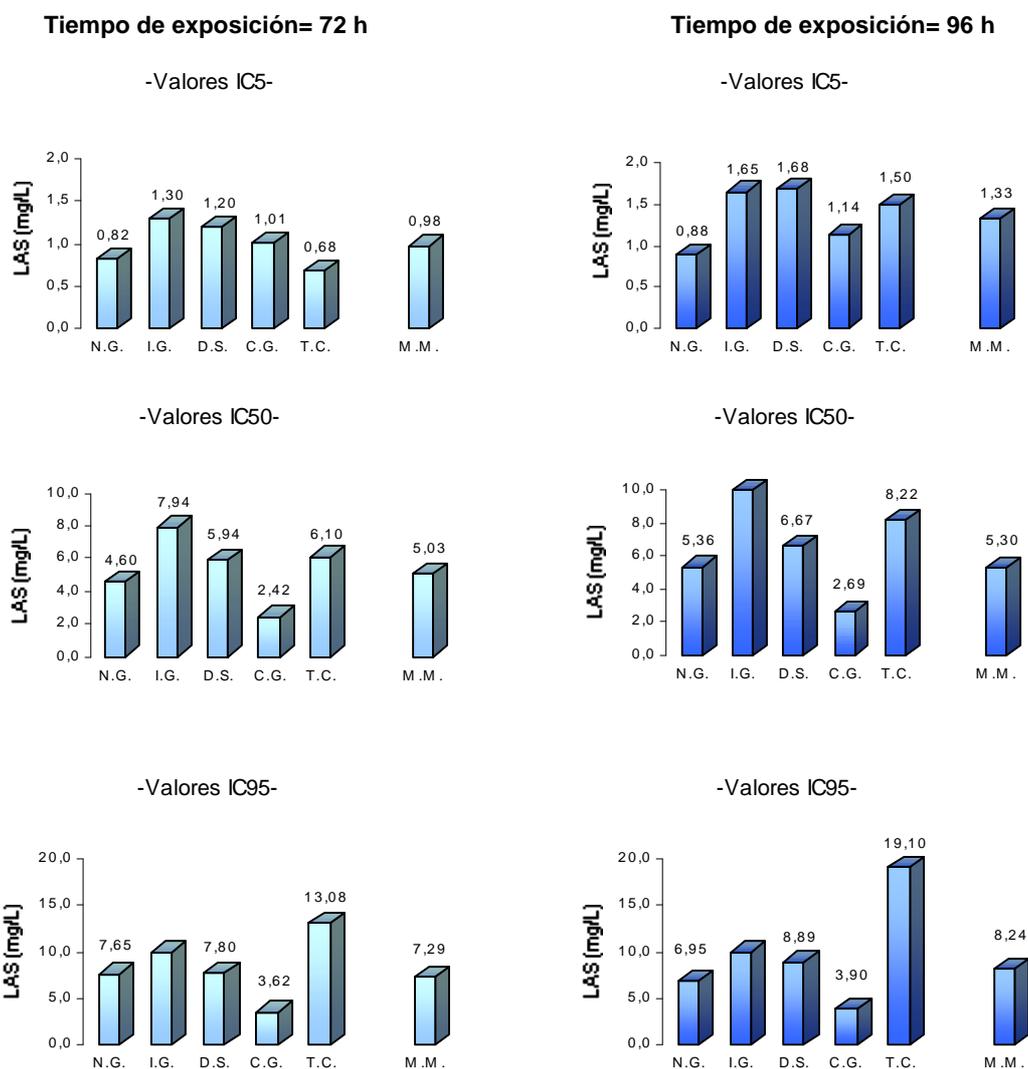
Método *bootstrap*. Valores medios; ICEI: Intervalo de confianza expandido inferior; ICES: Intervalo de confianza expandido superior

(*) No es posible calcular la interpolación lineal

(**) No es posible calcular los límites de confianza

Mediante gráficas de barras se han representado los valores obtenidos de las IC₅, IC₅₀ e IC₉₅ para las cinco microalgas de ensayo.

Ensayo de toxicidad del LAS



N.G.: *N. gaditana*; I.G.: *I. galbana*; D.S.: *D. salina*; C.G.: *C. gracilis*; T.C.: *T. chuii*;
 M.M.: Microalgas Marinas (valores correspondiente a la media geométrica de los valores obtenidos para las cinco algas de ensayo)

Figura C III.16. Resultados de IC₅, IC₅₀ e IC₉₅ del ensayo de toxicidad del LAS con 5 microalgas marinas para periodos de exposición de 72 y 96 horas

| | | IC5 | IC50 | IC95 |
|-------------|-----------------------|-------------|-------------|-------------|
| 72 h | + sensibilidad | T. chuii | C. gracilis | C. gracilis |
| | ↑ | N. gaditana | N. gaditana | N. gaditana |
| | ↓ | C. gracilis | D. salina | D. salina |
| | - sensibilidad | D. salina | T. chuii | T. chuii |
| | | I. galbana | I. galbana | I. galbana |
| | | IC5 | IC50 | IC95 |
| 96 h | + sensibilidad | N. gaditana | C. gracilis | C. gracilis |
| | ↑ | C. gracilis | N. gaditana | N. gaditana |
| | ↓ | T. chuii | D. salina | D. salina |
| | - sensibilidad | I. galbana | T. chuii | T. chuii |
| | | D. salina | I. galbana | I. galbana |

Figura C III.17. Sensibilidad de las especies de microalgas frente al tensioactivo aniónico LAS

Antes de realizar el comentario acerca de los resultados de ICp obtenidos para las diferentes microalgas hay que realizar dos consideraciones acerca del método de cálculo de éstas.

- En los ensayos de toxicidad con microalgas la tendencia general es que, a medida que la concentración de tóxico aumenta, el crecimiento de la población de algas es igual o inferior que la del grupo control. Como ya se comentó en el apartado 3.1.3.2.2.3.2. del presente capítulo, la rutina de análisis del programa ICPin V 2.0 precisa que la relación concentración-respuesta presente una tendencia monótona descendente, de modo que se producirá un suavizado de los resultados cuando se cumpla alguna de estas situaciones:
 - ✘ Cuando se observen fenómenos de sobrecrecimiento, esto es, cuando el crecimiento observado en algún tratamiento de tóxico sea superior al observado en la población control.
 - ✘ Cuando un tratamiento de tóxico presente un crecimiento menor a un tratamiento de tóxico de concentración superior.
- Otra cuestión importante que hay que considerar es que el programa ICPin no trabaja con datos negativos. Si el programa identifica alguno de éstos, inmediatamente es sustituido por ceros.

Puesto que para el análisis de datos de los ensayos de toxicidad se considerarán los resultados de biomasa normalizada (abs^{-1}), los resultados del cálculo de los diferentes ICp estarán muy condicionados por los resultados de aquellas concentraciones de tensioactivo que han causado una muerte parcial de la población de microalgas.

En las gráficas mostradas en la Figura C III.16. se representan los valores de IC₅, IC₅₀ e IC₉₅ a las 72 y 96 h de exposición obtenidos en los ensayos del LAS y las cinco especies de microalgas de ensayo. La última columna de cada gráfico representa la media geométrica de los valores de ICp obtenidos para cada microalga.

Respecto a los valores de IC₅ (72 h), el rango de concentraciones obtenido para el conjunto de microalgas oscila entre 0,68 mg/L obtenido para *T. chuii* y 1,30 mg/L para *I. galbana*. Estos resultados no son comparables con ningún resultado bibliográfico puesto que no se han encontrado referencias que muestren valores de IC₅ en microalgas marinas. A las 96 h de exposición estas concentraciones son ligeramente superiores a las obtenidas a las 72 horas lo cual indican una adaptación del alga al tóxico.

Los valores de IC₅₀ calculados a las 72 horas de exposición oscilan entre los 2,42 mg/L obtenidos para *C. gracilis* y los 7,94 mg/L obtenidos para *I. galbana*. Respecto a la comparación de resultados con datos bibliográficos (Anexo II) no se ha encontrado muchas referencias bibliográficas en las cuales los autores ensayen este tipo de compuestos con las microalgas seleccionadas. Utsunomiya *et al.* (1997) obtiene valores de IC₅₀ para *D. salina* a las 24 horas de exposición de 3,5 mg/L, valor que está dentro de los órdenes de magnitud de los resultados obtenidos para este alga en el presente trabajo. Perales (2001) realiza un estudio de toxicidad del LAS en agua de mar sintética:

| Microalgas marinas | Este trabajo IC ₅₀ (mg/L) (72 h) | Perales (2001) IC ₅₀ (mg/L) (72 h) -Agua de mar sintética- |
|--------------------|--|---|
| <i>N. gaditana</i> | 4,60 | 5,26 |
| <i>I. galbana</i> | 7,94 | 6,75 |
| <i>D. salina</i> | 5,94 | 5,15 |
| <i>C. gracilis</i> | 2,42 | 2,15 |
| <i>T. chuii</i> | 6,10 | 4,27 |

Como se puede observar, ambos grupos de concentraciones son muy parecidos y perfectamente comparables.

Al igual que ocurría para la IC_5 , para periodos de exposición de 96 horas se obtienen valores superiores de IC_{50} a los obtenidos a las 72 h, corroborando el hecho anteriormente descrito de que las microalgas se adaptan al tóxico. Para *I. galbana* no ha sido posible calcular la IC_{50} a este nivel de efecto puesto que la mayor concentración de ensayo de 10 mg/L no supera el 50 % de efecto y por tanto no es posible realizar la interpolación lineal y aplicar posteriormente el método *bootstrap*. Para este alga, el valor de IC_{50} sería mayor de 10 mg/L de LAS.

Respecto a los valores de IC_{95} calculados a las 72 horas de exposición, el rango de concentraciones obtenido para el conjunto de microalgas oscila entre 3,62 mg/L obtenido para *C. gracilis* y 13,08 mg/L para *T. chuii*. Estos resultados no son comparables con ningún resultado bibliográfico puesto que no se han encontrado referencias que muestren este nivel de efecto en microalgas marinas. Los valores obtenidos de IC_{95} a las 96 h de exposición muestran dos comportamientos diferenciados en función de las microalgas que se considere:

- En el caso de *N. gaditana*, el valor de la IC_{95} para un periodo de exposición de 96 h disminuye respecto al obtenido a las 72 h, lo cual indica que el alga aumenta su sensibilidad al tóxico con el tiempo.
- Para el resto de las microalgas, la evolución de la IC_{95} con el periodo de exposición es análoga a la comentada para la IC_5 e IC_{50} , esto es, aumenta, indicando una adaptación al tóxico.

La única referencia bibliográfica encontrada a este nivel de efecto es relativa a concentraciones alquísticas obtenidas por Painter y Zabel (1988) para *Dunaliella tertiolecta* los cuales establecen que concentraciones de LAS ensayadas en el rango entre 2 y 4 mg/L presentaban un comportamiento alquístico. Los resultados obtenidos para las cinco microalgas marinas son muy superiores a las concentraciones obtenidas por estos autores. Estas diferencias pueden deberse a dos causas. La primera es que la especie utilizada es diferente, y la segunda y presumiblemente la más posible, es que el tensioactivo LAS no es único. En el mercado se encuentran distintas formulaciones que difieren entre sí principalmente en la proporción de homólogos que la componen, de tal forma que podemos encontrar formulaciones de longitud de cadena alquímica media desde 11 hasta 13 átomos de carbono. La toxicidad del compuesto es muy dependiente de esta longitud siendo más tóxicas las formulaciones de mayor longitud de cadena alquímica (Perales, 2001).

A partir de los resultados de IC_p mostrados en la figura C III.16., se han clasificado las microalgas de ensayo en función de su sensibilidad/resistencia al tensioactivo aniónico LAS. Los resultados quedan reflejados en la figura C III.17.

Puesto que no ha sido posible calcular las concentraciones para niveles de efecto superiores al 50%, se ha incluido este alga en la clasificación como el alga más resistente al LAS.

Respecto a la clasificación global, se observa una gran diferencia entre la columna que muestra el orden de las algas para IC_5 y el orden seguido en las columnas de IC_{50} e IC_{95} .

En la columna de IC_5 a 72 horas, el alga que muestra más sensibilidad al tóxico es *T. chuii* presentando un 5% de inhibición de su crecimiento para concentraciones de 0,68 mg/L de LAS. El alga más resistente es *I. galbana* la cual presenta un 5% de inhibición de su crecimiento para concentraciones de LAS de 1,30 mg/L. A las 96 horas de ensayo, cambia el orden relativo de las microalgas mostrando mayor sensibilidad *N. gaditana* a 0,88 mg/L de y la más resistente es *D. salina* a 1,68 mg/L de LAS.

Respecto a las respuestas de IC_{50} e IC_{95} a 72 y 96 horas de exposición se observa la misma clasificación de algas en función de su sensibilidad para ambos periodos de exposición. *C. gracilis* se clasifica como el alga más sensible al LAS seguida de *N. gaditana*, *D. salina* y *T. chuii*. Finalmente, *I. galbana* es el alga ensayada más resistente al LAS.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Para la determinación de las concentraciones alguistáticas y alguicidas del LAS, a las 96 horas de ensayo se tomó una alícuota (0,1 mL) de los cultivos correspondientes a las concentraciones más altas de tóxico. Cada una de estas alícuotas se introdujo en un vial con medio fresco (aguas de mar sintética + nutrientes), se midió la turbidez de los cultivos a 690 nm, y se dejaron incubar en las mismas condiciones de luz y temperatura del ensayo. Transcurridos 10 días, se realizaron nuevas medidas de turbidez de estos cultivos.

La concentración alguistática se corresponde con la mayor concentración de tóxico en la cual se observa una recuperación de la población de algas (aumento en la concentración de biomasa de los cultivos).

La concentración alguicida se corresponde con la menor concentración de tóxico en la cual no se observa una recuperación de la población de algas (no hay cambios en la concentración de biomasa de los cultivos).

Los resultados obtenidos para las cinco microalgas son los siguientes:

| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> |
|----------------------------|--|--|--|--------------------|--|
| Concentración alguistática | 10 mg/L | 10 mg/L | 10 mg/L | 8 mg/L | 20 mg/L |
| Concentración alguicida | No se ha determinado experimentalmente | No se ha determinado experimentalmente | No se ha determinado experimentalmente | 10 mg/L | No se ha determinado experimentalmente |

Para las algas *N. gaditana*, *I. galbana*, *D. salina* y *T. chuii* se produjo un aumento de la concentración de biomasa de todos los cultivos, por tanto, se define la concentración alguistática como la mayor concentración ensayada para cada alga.

Para *C. gracilis* se observó un aumento en la concentración de la biomasa en los viales en los que se cultivó las alícuotas procedentes de las concentraciones de 8 mg/L de LAS. Además, se constató la presencia de células del alga por observación directa del cultivo mediante un microscopio óptico.

Los viales en los que se cultivaron las alícuotas de los tratamientos de 9 mg/L, se observó mediante mediciones de turbidez, un ligero aumento de la concentración de biomasa del cultivo, sin embargo no se constató la presencia de células sanas mediante observación directa del cultivo en el microscopio.

Finalmente, los viales de cultivo de los inóculos procedentes de 10 mg/L no mostraron ningún cambio significativo de la turbidez.

CONSIDERACIONES ADICIONALES SOBRE LOS VALORES NOEC, IC_p Y ALGUICIDAS

Antes de finalizar este apartado es necesario realizar un reflexión acerca de las concentraciones que estima este método de análisis y las concentraciones umbrales y alguicidas que se obtienen de forma estadística y experimental respectivamente.

Los niveles umbrales LOEC y NOEC se obtienen mediante pruebas estadísticas. Por otra parte, mediante el programa ICpin se han estimado las concentraciones que causan un efecto próximo a los niveles umbrales (IC₅). Por definición las IC₅ deben ser superiores a las NOEC. Sin embargo, para el caso de los resultados obtenidos a las 96 h de exposición con *I. galbana*, *D. salina* y *T. chuii* los valores NOEC son superiores a las IC₅ estimadas. Puesto que los NOEC están fundamentados de forma estadística, es lógico pensar que en estas ocasiones la estimación de estos IC₅ (u otras IC_p en situación similar) no es adecuada o deben interpretarse con precaución.

De la misma forma, el método IC_p estima las concentraciones que causan un porcentaje de efecto del 95%, porcentaje muy próximo a los niveles alguicidas. Como veremos a continuación, en el ensayo de LAS no se produce una incongruencia entre las IC₉₅ y las concentraciones alguicidas, pero si puede ser el caso de otros ensayos con otros compuestos. En estos casos, la concentración alguicida obtenida experimentalmente debe prevalecer sobre la IC₉₅ o cualquier otra IC_p cuya estimación sea superior al valor experimental.

4.1.1.2. ENSAYOS CON CRUSTÁCEOS. ARTEMIA

En este apartado se muestran los resultados de toxicidad obtenidos para poblaciones de *Artemia* expuesta a diversas concentraciones de LAS.

Antes de realizar el ensayo definitivo de toxicidad, se llevó a cabo un ensayo preliminar al objeto de determinar un rango de concentraciones, en el cual se observarían concentraciones con todos los organismos vivos, hasta concentraciones en las cuales se producía un 100% de mortalidad de la población. Los resultados de este ensayo preliminar mostraron estos efectos en el rango de concentraciones de 0,5 a 20 mg/L de LAS. A partir de este rango, se seleccionaron las concentraciones siguientes:

| <u>Especie</u> | <u>Concentración de LAS (mg/L)</u> | | | | | | | | | | |
|----------------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|
| <i>Artemia</i> | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 4,0 | 6,0 | 8,0 | 10,0 | 14,0 | 16,0 | 20,0 |

Otra cuestión a considerar antes de presentar los resultados es el tiempo de exposición. Las pruebas de toxicidad letal de microcrustáceos sin aporte de alimentación no suelen alargarse hasta las 72 horas de ensayo (Weber, 1993; Rand, 1995) puesto que los porcentajes de mortalidad de los controles suelen no cumplir el criterio de control de calidad preestablecido para estos ensayos por los procedimientos de ensayo (APHA *et al.*, 1989; Weber, 1993). Sin embargo, en los ensayos preliminares no se observó mortalidad en los controles de *Artemia* a las 72 h y por tanto se amplió la duración del ensayo hasta este periodo de exposición. La siguiente gráfica muestra una representación de los porcentajes de supervivientes obtenidos en cada periodo de ensayo.

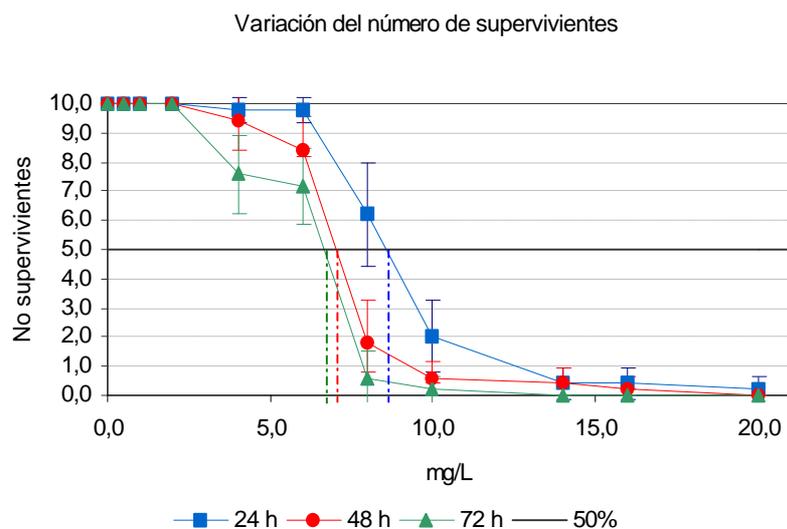


Figura C III.18. Variación del número de supervivientes del ensayo de toxicidad del LAS y *Artemia*

Para el cálculo de las diferentes expresiones de toxicidad, se han seguido los diagrama de flujo indicados en las figuras C III.8. (concentraciones umbrales) y C III.11 (EC_p).

DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES

Para el cálculo de los efectos umbrales, hay que realizar una estudio previo acerca de la normalidad de los datos mediante el test de Shapiro Wilk, y de la homogeneidad de la varianza de los replicados mediante el test de Barlett. Finalmente, se calculan los efectos umbrales realizando el test de Dunnett, y las pruebas "t" individuales con cada concentración de ensayo y el control. Para poder realizar todos estos análisis, se trabajó con resultados transformados mediante el arcoseno de la raíz cuadrada de los porcentajes de supervivientes (Weber, 1993; Rand, 1995).

Como se puede observar en la gráfica, en las primeras concentraciones de tóxico y en el control no se observó mortalidad en ninguno de los 5 replicados. Este hecho es muy importante ya que condiciona todo el procedimiento de cálculo de los niveles umbrales (varianzas igual a cero) y no puede aplicarse el procedimiento formal.

El hecho de no obtenerse resultados de mortalidad en ninguno de los replicados de los controles, y en algunas concentraciones de tóxico, ha sido generalizado en todos los compuestos de ensayo. Así pues, y si bien no es un procedimiento de análisis formal sino más bien observaciones visuales, para el compuesto LAS y en general para todos los compuestos de ensayo, se comentarán aquellas concentraciones en las cuales no se aprecie mortalidad en ninguno de sus replicados. Éstas se considerarán las concentraciones de no-efecto y por lo tanto, la concentración inmediatamente superior se considerará como la concentración de efectos mínimos observados.

Una vez hecha esta consideración, se establece la concentración de no-efecto para el ensayo de toxicidad aguda de *Artemia* y el LAS en 4 mg/L a las 24 horas, de 1 mg/L a las 48 horas, y de 0,5 mg/L a las 72 horas de ensayo. Por tanto, los efectos mínimos observados quedan definidos por las concentraciones de 6 mg/L a las 24 horas, 2 mg/L a las 48 horas, y 1 mg/L a las 72 horas de exposición. Como cabría esperar, cuanto mayor es el tiempo de exposición, mayor es el efecto que ejerce el tóxico sobre la *Artemia*.

DETERMINACIÓN DE LAS EC(p)

Método de interpolación gráfica

Mediante el método de interpolación gráfica, se han determinado los valores de LC₅₀ para cada periodo de exposición. Los resultados fueron los siguientes:

| LAS (mg/L) | 24 h | 48 h | 72 h |
|------------------|------|------|------|
| LC ₅₀ | 8,6 | 7,0 | 6,7 |

Método Probit

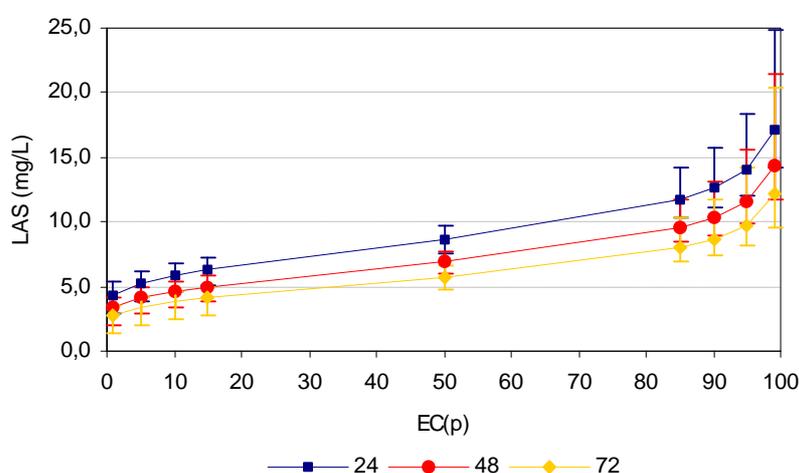
Las siguiente tabla muestras los valores medios para diversos LC(p) obtenidos mediante el método Probit. En el Anexo II se pueden consultar los límites de confianza obtenidos para cada concentración estimada.

Tabla CIII.18. Resultados de diferentes LC(p) obtenidos mediante el método Probit

| | 24 h | 48 h | 72 h |
|-------------|--------|--------|--------|
| LC/EC 1,00 | 4,325 | 3,334 | 2,731 |
| LC/EC 5,00 | 5,295 | 4,129 | 3,397 |
| LC/EC 10,00 | 5,897 | 4,628 | 3,816 |
| LC/EC 15,00 | 6,342 | 4,998 | 4,128 |
| LC/EC 50,00 | 8,625 | 6,918 | 5,753 |
| LC/EC 85,00 | 11,730 | 9,577 | 8,017 |
| LC/EC 90,00 | 12,615 | 10,343 | 8,672 |
| LC/EC 95,00 | 14,051 | 11,592 | 9,742 |
| LC/EC 99,00 | 17,199 | 14,356 | 12,118 |

χ^2 calculado (24 h)=29,052; χ^2 calculado (48 h)= 19,675; χ^2 calculado (72 h)= 24,642; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados hay que interpretarlos con precaución (Notación del programa Probit)

En la siguiente gráfica se representan estos valores y sus límites de confianza.

**Figura C III.19. Valores de EC(p) calculados mediante el método Probit**

Tal y como reflejan tanto los resultados obtenidos mediante el método de interpolación gráfica, como los obtenidos mediante el método Probit, a medida que transcurre el ensayo, el crustáceo presenta una mayor toxicidad al compuesto. Dicho de otra forma, para un determinado efecto, cuanto mayor es el tiempo de exposición, menor es la concentración de tóxico que causa ese efecto. En el caso de la LC₅₀ se obtienen valores de 8,6, 7,0 y 6,7 mg/L de LAS mediante interpolación gráfica, y de 8,63, 6,92, y 5,75 mg/L de LAS para periodos de exposición de 24, 48 y 72 horas respectivamente. Significar la gran semejanza de los resultados obtenidos por ambos métodos de cálculo.

Comparando estos resultados con datos bibliográficos se obtienen ordenes de magnitud similares a los obtenidos con otras especies (Anexo II). En relación con *Artemia*, Perales (2001) determina un valor de LC₅₀ a las 24 horas de 11,62 mg/L de LAS. Painter y Zabel (1988) determinan varios valores de LC₅₀ con otras especies de crustáceos, p.e. para *Mysidopsis bahia* obtienen una LC₅₀ a las 96 horas de exposición de 1,42 mg/L, y para el mismo periodo de exposición pero en ensayos con *Penaeus duorarum* obtienen una LC₅₀ de 66 mg/L. El rango de concentraciones LC₅₀ bibliográfico oscila entre 0,1 y 66 mg/L.

4.1.1.3. ENSAYOS CON BACTERIAS MARINAS. *VIBRIO FISCHERI*

En este apartado se muestran los resultados de toxicidad obtenidos para el ensayo de bacterias marinas LumisTox® el cual utiliza como especie de ensayo la bacteria marina *Vibrio fischeri*.

Las concentraciones de ensayo utilizadas para la realización de esta prueba fueron las siguientes:

| <u>Especie</u> | <u>Concentración de LAS (mg/L)</u> | | | | | | | | |
|------------------------|------------------------------------|-------|-------|-------|--------|-------|------|------|-------|
| <i>Vibrio fischeri</i> | 0,0 | 1,251 | 2,502 | 5,013 | 10,025 | 20,05 | 40,1 | 80,2 | 802,0 |

La solución madre para la realización de esta prueba fue de 802,0 mg/L LAS. A partir de ésta se fabricó un patrón de 80,2 mg/L (dilución 1/10) con el que se comenzó una serie de diluciones sucesivas al objeto de obtener diversas concentraciones de ensayo.

Para esta prueba, el control de calidad del ensayo lo establece una disolución estándar que proporciona el fabricante y que hay que introducir en la batería de ensayo. Se acepta el ensayo cuando la inhibición de este compuesto para $t=30$ min, oscila entre el 40 y el 60 % de acuerdo con la DIN 38412 L 34; L 341. En el ensayo de toxicidad del LAS, el porcentaje de inhibición de la luminiscencia de las bacterias expuesto a este compuesto fue del 43,0%.

Si bien este porcentaje se encuentra en el límite de aceptabilidad, los resultados obtenidos en este ensayo deben interpretarse con precaución.

Para calcular el valor de las EC(p) se ha linealizado la curva de inhibición de la bioluminiscencia presentada en la gráfica que se muestra a continuación, convirtiendo los valores de porcentaje de inhibición en valores (γ) según se describe en el apartado de material y métodos de este tipo de ensayos (apartado 3.3.3.4. del presente capítulo). Aquellas concentraciones de tensioactivo a las cuales les correspondan valores de $\gamma=1$, $\gamma=0,5$, y $\gamma=0,1$, presentarán una inhibición de la luminiscencia del 50, 25 y 5% respectivamente.

En la siguiente figura se muestran los diferentes porcentajes de respuesta para cada concentración ensayada.

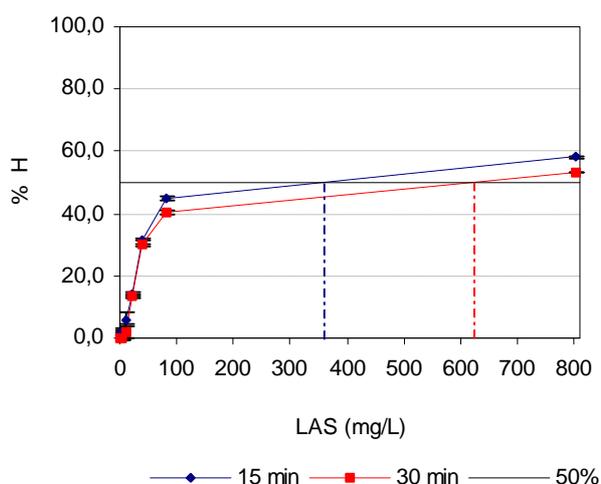


Figura C III.20. Variación de la inhibición del crecimiento con la concentración en el ensayo de toxicidad del LAS y *Vibrio fischeri*

En esta gráfica se pueden distinguir dos regiones diferenciadas. La primera se sitúa en la zona inferior de la gráfica y muestra una relación lineal ascendente que correlaciona los porcentajes de inhibición y la concentración de tóxico. La segunda está delimitada por las concentraciones de 802 y 80,2 mg/L de LAS y se muestra como una asíntota por debajo del nivel de efecto del 60 %.

Los resultados de EC_{50} obtenidos mediante el método de interpolación gráfica fueron los siguientes:

Tabla C III.19. $EC(p)$ obtenidos mediante el método de interpolación gráfica en el ensayo de toxicidad del LAS y *Vibrio fischeri*

| | $t=15 \text{ min}$ | $t=30 \text{ min}$ |
|-----------|--------------------|--------------------|
| EC_5 | 13,62 | 15,85 |
| EC_{25} | 44,2 | 51,59 |
| EC_{50} | 359,5 | 627,8 |

Los resultados calculados de EC_{50} muestran concentraciones muy diferentes para los dos periodos de exposición, EC_{50} ($t=15\text{min}$)= 359,5 mg/L LAS y EC_{50} ($t=30 \text{ min}$)=627,8 mg/L. Esto es debido a la forma que toma la curva de inhibición frente a la concentración (ver figura). Consultando la bibliografía se observa que Perales (2001) obtiene para este compuesto una curva de efecto muy similar a la presentada en la figura anterior, esto es, un tramo inferior lineal y una asintotización de los porcentajes de inhibición en el tramo superior. Para este autor, la asíntota se produce por debajo del 80% de efecto, y la EC_{50} calculada para $t=15 \text{ min}$ es de 35,95 mg/L LAS.

Una posible explicación de la asintotización de la respuesta pudiera ser que dado que en el rango de 80,2 a 802 mg/L se sitúa en el rango concentraciones próximas a la concentración micelar crítica (entre 0.3 y 3 g/L, Di Toro *et al.*, 1990), se pueden estar produciendo micelas y por lo tanto, una menor biodisponibilidad del agente de superficie, y de ahí que la curva se asintotice.

Debido a las grandes diferencias de concentración obtenidas para las EC_{50} calculadas en los dos tiempos de exposición, se ha optado por calcular también mediante el método de interpolación gráfica, las concentraciones correspondientes a otros efectos, en concreto para EC_5 , y EC_{25} las cuales representarían las concentraciones de tóxico que causan el 5 y el 25% de inhibición de la luminiscencia respectivamente.

Los resultados obtenidos para estas respuestas están más acordes con los datos bibliográficos y con los resultados de toxicidad obtenidas con otras especies de ensayo (microalgas y *Artemia*).

Finalmente para este ensayo se concluye que las concentraciones EC_{50} obtenidas en este ensayo no son adecuadas puesto que difieren considerablemente en los dos periodos de exposición de este ensayo y pueden que estén ocurriendo procesos que restan biodisponibilidad del compuesto. Las concentraciones EC_{25} y EC_5 sí son adecuadas puesto que los resultados obtenidos para cada una de ellas en ambos periodos de exposición son muy similares.

4.1.1.4. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL ENSAYO DEL LAS

A partir de los resultados obtenidos con los tres taxones de ensayo se obtienen las siguientes conclusiones generales:

Resultados con microalgas:

- i) Los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad con cinco microalgas y el tensioactivo aniónico LAS demuestran que el diseño experimental y las medidas de biomasa obtenidas en función de la turbidez de la muestra, permiten obtener un conjunto de resultados de toxicidad coherentes y en los rangos bibliográficos.
- ii) Los diferentes resultados obtenidos en cada nivel de efecto (umbral, inhibición parcial del crecimiento y niveles alguistáticos/alguicidas) permiten afirmar que la toxicidad del LAS depende de la especie de ensayo y del tiempo de exposición.
- iii) En relación con el nivel de efecto umbral se puede concluir que los valores NOEC están muy condicionados al diseño experimental y suelen estar subestimados. Al objeto de poder sustituirlos por otra expresión de toxicidad se calcularon diferentes IC₅ sin embargo se ha comprobado que éstas no son buenas expresiones de niveles umbrales puesto que se contradice con valores NOEC. El nivel más estricto NOEC establecido es 1mg/L.
- iv) Se han obtenidos resultados coherentes de IC₅₀ con límites de confianza estrechos lo cual indica una buena precisión en los resultados. Las concentraciones de LC₅₀ obtenidas a las 72 horas oscilan entre 2,42 y 7,94 mg/L, y a las 96 horas entre 2,69 y 8,22 mg/L de LAS.
- v) En función de la IC₅₀ se obtiene una escala de sensibilidad al tóxico:

| | |
|----------------------------|------------------------------|
| ← + sensible al LAS | + resistente al LAS → |
| <i>C. gracilis</i> | <i>I. galbana</i> |
| <i>N. gaditana</i> | <i>T. chuii</i> |
| <i>D. salina</i> | |

- vi) Respecto al nivel alguicida, es necesario realizar nuevas experiencias al objeto de determinar estas concentraciones.

Resultados con Artemia:

- vii) Los resultados obtenidos tanto en el control como en las concentraciones de ensayo permiten afirmar que el diseño experimental ha sido correcto obteniéndose resultados coherentes y dentro de los rangos bibliográficos. La concentración umbral más baja observada es de 0,5 mg/L a las 72 horas de exposición. Las diferentes LC₅₀ varían entre 8,63 obtenida a las 24 h y 5,75 a las 72 horas de exposición.

Resultados con Vibrio fischeri:

- viii) La gran diferencia obtenida en resultados de EC₅₀ a los 15 y 30 min permiten afirmar que los valores obtenidos para la concentración más alta ensayada no son correctos. En este sentido, sería conveniente realizar nuevos ensayos para la obtención de estas expresiones de toxicidad.
- ix) Por el contrario, las concentraciones EC₅ y EC₂₅ son muy similares en ambos periodos de exposición y por tanto se consideran válidas.

Resultados comparativos:

- x) Las algas son más sensibles al nivel de efecto umbral, que el resto de organismos ensayados.
- xi) Respecto a la IC₅₀ (72 h) y LC₅₀ (72 h), la *Artemia* presenta un comportamiento intermedio al obtenido en las algas. En la clasificación anteriormente realizada se situaría entre *N. gaditana* y *D. salina*.
- xii) Las bacterias luminiscentes fueron las que presentaron una mayor resistencia al LAS (EC₂₅).

4.1.2. TOXICIDAD DEL TENSIOACTIVO NO-IÓNICO NP9EO

4.1.2.1. ENSAYOS CON MICROALGAS MARINAS

El ensayo preliminar realizado con NP9EO o tergitol NP-9 mostró que se producía un importante descenso de la velocidad de crecimiento en el rango de 1 a 10 mg/L de NP9EO para las algas *N. gaditana*, *I. galbana*, y *C. gracilis*. Para las especies *D. salina* y *T. chuii* este rango de concentraciones de efecto se situó entre 2 y 20 mg/L. A partir de estos resultados se seleccionaron las 10 concentraciones utilizadas en el ensayo definitivo que fueron las siguientes:

| <u>Especies</u> | <u>Concentración de NP9EO (mg/L)</u> | | | | | | | | | | |
|------------------------------------|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|------|------|
| <i>D. salina</i> , <i>T. chuii</i> | 0,0 | 2,0 | 4,0 | 6,0 | 8,0 | 10,0 | 12,0 | 14,0 | 16,0 | 18,0 | 20,0 |
| Resto de microalgas | 0,0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 6,0 | 7,0 | 8,0 | 9,0 | 10,0 |

Al comienzo del ensayo, y cada 24 horas de exposición, se realizaron medidas de concentración de biomasa. Una vez terminado el ensayo, estas medidas se normalizaron tal y como se describió en el apartado 4.1.1.1. del presente capítulo.

En la figura C III.21. se muestra la evolución temporal de la concentración de biomasa normalizada.

Respecto a las tres especies de rango de concentraciones inferior, *I. galbana* y *C. gracilis* presentan un comportamiento muy similar. Para ambas especies, sólo la concentración inferior ensayada, esto es 1 mg/L de NP9EO, muestra un crecimiento similar al control. El resto de tratamientos se ven muy afectados por la presencia del tensioactivo obteniéndose valores de biomasa normalizada negativas en prácticamente todas las concentraciones y durante todo el periodo de ensayo. Este descenso llega a ser crítico en las concentraciones más altas obteniéndose valores de biomasa normalizada en torno a $-0,300$. Como ya se ha comentado anteriormente, el signo negativo de la biomasa normalizada indica una muerte parcial en la población de microalgas. En este sentido, los valores obtenidos en las concentraciones más altas indican una muerte prácticamente total de la población expuesta.

Transcurridas las primeras 48 horas de ensayo, se observa una adaptación de las poblaciones de algas a ciertos niveles del tóxico produciéndose una cierta recuperación en la biomasa de la población llegándose a alcanzar valores positivos de biomasa normalizada. Esta recuperación puede constatarse observando la gráfica de evolución de la biomasa durante 10 días de exposición. En esta gráfica se observa que incluso algunas concentraciones que no muestran recuperación a las 96 horas, sí lo hacen posteriormente.

N. gaditana muestra a priori, una mayor resistencia al tóxico puesto que sólo presenta valores negativos de biomasa normalizada en las mayores concentraciones de tóxico. En éstas, el alga muestra una inhibición del crecimiento pero no una muerte de la población durante las primeras 48 horas de ensayo. Transcurrido este periodo, las poblaciones expuestas a estas concentraciones se encuentran muy afectadas y comienza a disminuir la biomasa de los cultivos.

Respecto a las algas ensayadas en un rango más amplio de concentraciones, se observa a priori una mayor resistencia de *T. chuii* al tóxico. Si bien el alga se ve muy afectada durante las primeras 24 horas mostrando valores negativos de biomasa normalizada, a las 48 horas experimenta una recuperación en todos los tratamientos, llegándose a obtener valores positivos de biomasa normalizada a las 96 horas de exposición. El comportamiento de *D. salina* es similar, sin embargo, el periodo de adaptación al tóxico es mayor que el de *T. chuii*. A partir de las 72 horas de exposición, se observa una recuperación generalizada de todos los tratamientos aunque para las concentraciones más altas, no se llegan a alcanzar valores positivos a las 96 horas.

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo

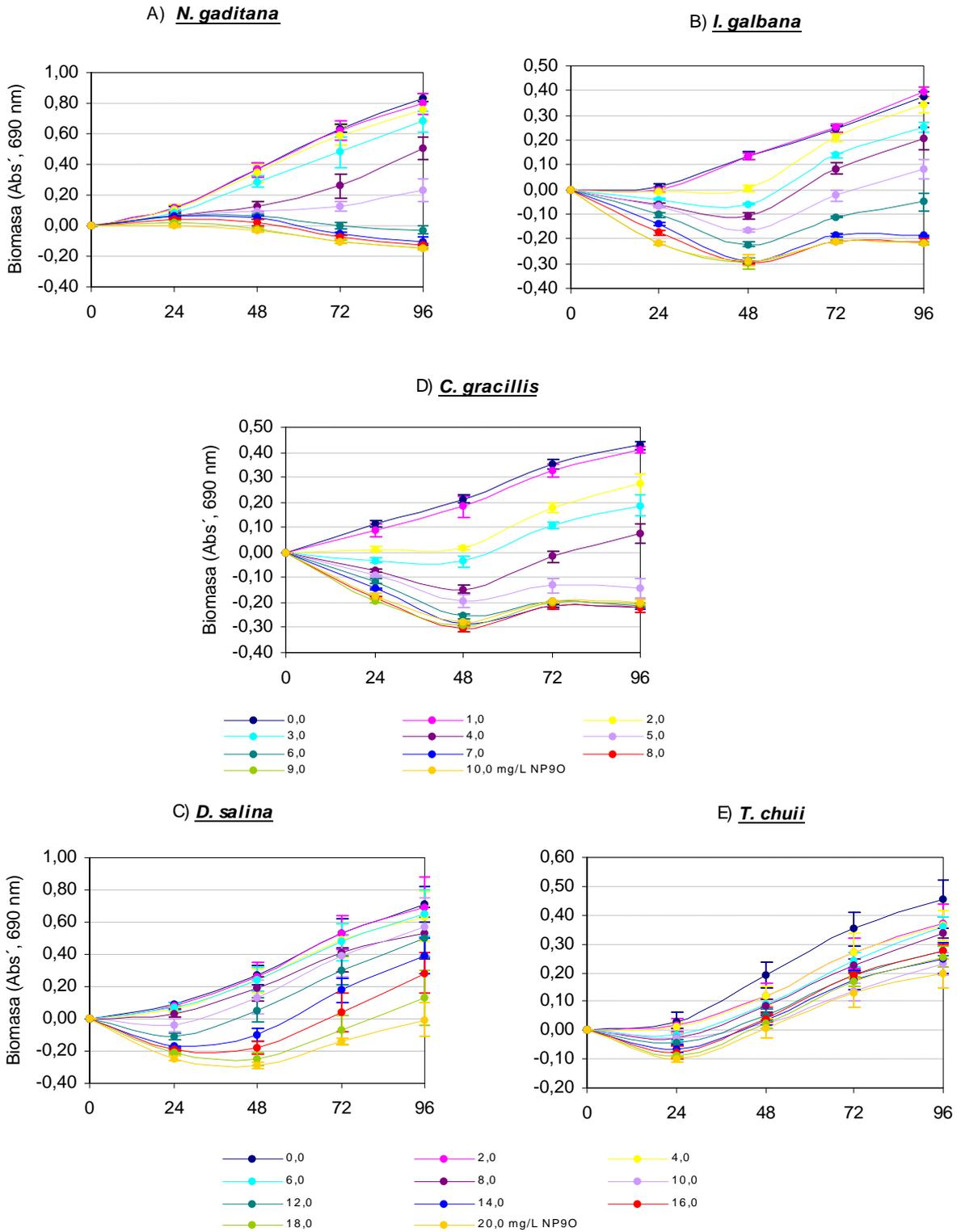


Figura C III.21. Evolución de la concentración de biomasa normalizada en el ensayo de toxicidad del NP9EO y microalgas marinas

En la figura C III.22. se muestra la variación de la concentración de biomasa normalizada en el rango de concentraciones de ensayo para cada periodo de exposición.

Observando las curvas dosis-respuesta de este ensayo se observa que para *N. gaditana*, *I. galbana*, *C. gracilis* y *T. chuii* el rango de concentraciones seleccionados es adecuado puesto que se observan ambos extremos (superior –concentraciones umbrales de efecto-; inferior –concentración alquística y alquida), y un tramo de pendiente acusada con varias concentraciones que muestran valores positivos de biomasa normalizada.

En el caso de *D. salina*, no se observa tramo inferior pero la concentración mayor ensayada (20 mg/L) pero muestra valores próximos a cero de biomasa normalizada indicando niveles de efecto cercanos al 100%.

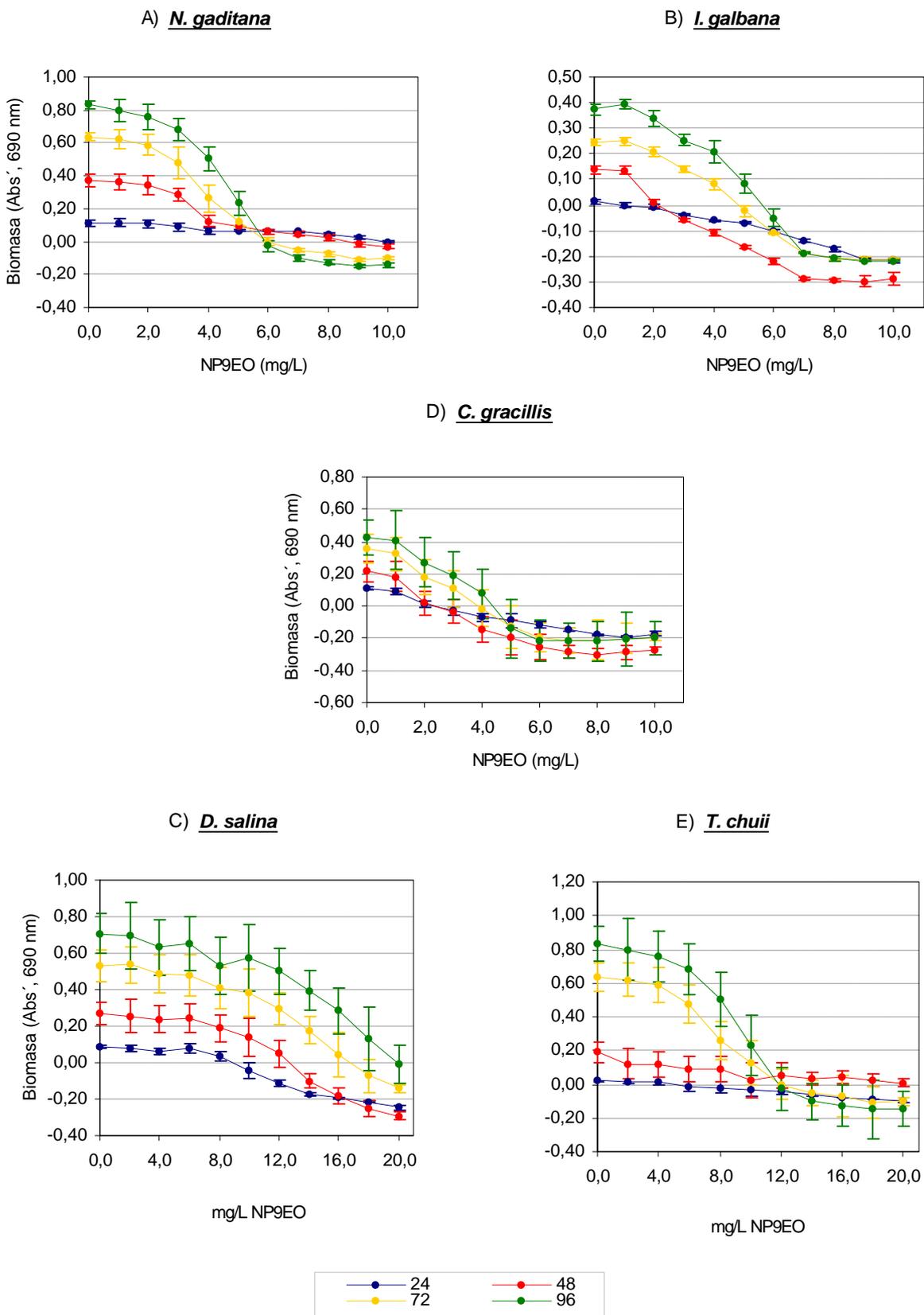


Figura C III.22. Variación de la concentración de biomasa normalizada con la concentración de NP9EO

OBTENCIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES

Se ensayó la normalidad de la distribución de resultados de crecimiento mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza mediante el test de Barlett. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla C III.20. W calculados del ensayo de NP9EO y microalgas marinas. Test de Shapiro Wilk

| Periodo de exposición | Test de Shapiro Wilk. W calculados | | | | | W crítico para N=33 y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 24 h | 0,965 | 0,950 | 0,964 | 0,964 | 0,982 | 0,931 |
| 48 h | 0,969 | 0,989 | 0,968 | 0,965 | 0,953 | |
| 72 h | 0,956 | 0,981 | 0,951 | 0,976 | 0,976 | |
| 96 h | 0,957 | 0,978 | 0,935 | 0,970 | 0,972 | |
| | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | |

Tabla C III.21. B calculados del ensayo de NP9EO y microalgas marinas. Test de Barlett

| Periodo de exposición | Test de Barlett. B calculados | | | | | B crítico para 10 grados de libertad y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|-------------------------------|----------------------------------|------------------|--------------------|-----------------|--|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 24 h | 11,78 | 4,76 | 14,96 | 11,50 | 10,56 | 18,31 |
| 48 h | 15,49 | 9,37 | 5,99 | 14,63 | 8,71 | |
| 72 h | 13,60 | 11,91 | 3,98 | 14,54 | 10,84 | |
| 96 h | 11,19 | 20,98 | 2,06 | 17,38 | 6,66 | |
| | Homogeneidad | Homogeneidad excepto para t=96 h | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | |

Los resultados mostrados en la tabla indican que todas las algas y para todos los periodos de exposición cumplieron la condición de normalidad y de homogeneidad de la varianza. La única excepción la mostró los resultados de homogeneidad obtenidos para *I. galbana* a las 96 horas. El no cumplimiento de esta condición se produjo por el efecto que ejerce en el estadístico de Barlett, la similitud de los valores de biomasa neta de las cuatro concentraciones superiores. Por ello, aunque no se cumplió esta condición, se continuó con el análisis de Dunnett.

Los resultados obtenidos de la aplicación del test de Dunnett fueron los siguientes:

Tabla C III.22. t calculados del ensayo de NP9EO y microalgas marinas (t=72 h). Método de Dunnett

| mg/L NP9EO | Test de Dunnett. Valores de t-calculados | | | | | | T crítica para 22 grados de libertad y 10 concentraciones |
|------------|--|-------------------|--------------------|------------|------------------|-----------------|---|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>C. gracilis</i> | mg/L NP9EO | <i>D. salina</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 1,0 | 0,49 | -0,31 | 1,88 | 2,0 | -0,03 | 2,56 | 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 2,0 | 1,68 | 3,36 (*) | 12,14 (*) | 4,0 | 0,46 | 2,62 | |
| 3,0 | 4,39 (*) | 10,01 | 17,03 | 6,0 | 0,59 | 3,34 (*) | |
| 4,0 | 11,89 | 15,21 | 25,72 | 8,0 | 1,33 | 3,97 | |
| 5,0 | 17,59 | 25,41 | 33,70 | 10,0 | 1,59 | 6,80 | |
| 6,0 | 21,94 | 33,47 | 38,19 | 12,0 | 2,60 | 4,93 | |
| 7,0 | 23,78 | 40,65 | 39,56 | 14,0 | 4,12 (*) | 5,50 | |
| 8,0 | 24,45 | 42,66 | 39,23 | 16,0 | 6,10 | 5,06 | |
| 9,0 | 25,69 | 43,00 | 38,59 | 18,0 | 7,87 | 5,69 | |
| 10,0 | 25,42 | 43,13 | 38,21 | 20,0 | 9,01 | 6,90 | |

Tabla C III.23. t calculados del ensayo de NP9EO y microalgas marinas (t=96 h). Método de Dunnett

| Test de Dunnet. Valores de t-calculados | | | | | | | |
|---|--------------------|-------------------|--------------------|---------------|------------------|-----------------|--|
| mg/L NP9EO | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>C. gracilis</i> | mg/L NP9EO | <i>D. salina</i> | <i>T. chuii</i> | <i>T crítica para 22 grados de libertad y 10 concentraciones</i> |
| 1,0 | 0,70 | -0,90 | 0,88 | 2,0 | -0,09 | 2,33 | |
| 2,0 | 1,48 | 1,35 | 7,58 (*) | 4,0 | 0,34 | 2,60 | |
| 3,0 | 3,06 (*) | 5,08 (*) | 11,77 | 6,0 | 0,41 | 2,71 (*) | 2,64 |
| 4,0 | 6,97 | 7,22 | 17,21 | 8,0 | 1,03 | 3,23 | |
| 5,0 | 14,05 | 13,27 | 27,87 | 10,0 | 1,13 | 6,26 | |
| 6,0 | 22,41 | 20,67 | 31,52 | 12,0 | 1,63 | 4,96 | |
| 7,0 | 25,13 | 29,31 | 31,63 | 14,0 | 2,55 | 5,73 | |
| 8,0 | 26,19 | 30,85 | 31,75 | 16,0 | 3,57 (*) | 5,06 | |
| 9,0 | 27,09 | 31,41 | 31,04 | 18,0 | 5,22 | 5,55 | |
| 10,0 | 26,88 | 31,44 | 30,63 | 20,0 | 6,77 | 7,16 | |

* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola).

La siguiente tabla muestra un resumen de los resultados umbrales obtenidos:

Tabla C III.24. Valores NOEC y LOEC obtenidos en el ensayos del NP9EO y las microalgas marinas

| 72 h | Microalgas Marinas | | | | |
|------|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> |
| NOEC | 2,0 | 1,0 | 12,0 | 1,0 | 2,0 |
| LOEC | 3,0 | 2,0 | 14,0 | 2,0 | 3,0 |
| 96 h | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> |
| NOEC | 2,0 | 2,0 | 14,0 | 1,0 | 2,0 |
| LOEC | 3,0 | 3,0 | 16,0 | 2,0 | 3,0 |

Los resultados mostrados en la tabla, indican que respecto a los efectos umbrales, el alga más sensible a las 72 y 96 horas de exposición es *C. gracilis* determinándose mediante el test de Dunnett una LOEC de 2 mg/L y por tanto la NOEC queda definida por la concentración de 1 mg/L de NP9EO. *I. galbana* presenta valores umbrales similares a *C. gracilis* a las 72 horas, sin embargo, los valores calculados a las 96 horas (LOEC= 3 mg/L y NOEC= 2mg/L) indican una adaptación del alga al tóxico a este nivel de efecto. *N. gaditana* y *T. chuii* presentaron los mismos efectos umbrales (LOEC=3 mg/L y NOEC= 2mg/L) a las 72 y 96 horas de exposición. Finalmente, *D. salina* se mostró como el alga más resistente al tensioactivo obteniéndose para ella unos efectos umbrales de LOEC= 14,0 mg/L, y por tanto NOEC=12,0 mg/L a las 72 horas de exposición. A las 96 horas se identifica una adaptación del alga al tóxico, aumentando los niveles umbrales hasta LOEC=16 mg/L y NOEC=14 mg/L.

Notar que en función de los resultados del ensayo preliminar, para *T. chuii* y *D. salina* se incrementó el rango de concentraciones de ensayo (2-20 mg/L) lo cual podría indicar un comportamiento similar de ambas algas. Los resultados obtenidos respecto al nivel de efecto umbral indican una diferencia acusada en el comportamiento de ambas algas ante bajas concentraciones del tensioactivo presentándose *D. salina* como el alga más resistente del conjunto de algas ensayadas.

DETERMINACIÓN DE LAS IC_p

Los resultados de los valores medios de los IC_p calculados para cada una de las algas se muestra en la tabla siguiente. Una presentación más exhaustiva de los resultados (interpolación lineal simple, límites de confianza, desviación estándar), se recoge en el Anexo III del presente documento.

Tabla C III.25. *ICp* calculados en el ensayo de NP9EO y microalgas marinas

| t (h) | Expresión de toxicidad | Valores de <i>ICp</i> | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|------------------------|-----------------------|-------|------|-------------------|-------|------|------------------|-------|-------|--------------------|-------|------|-----------------|-------|-------|
| | | <i>N. gaditana</i> | | | <i>I. galbana</i> | | | <i>D. salina</i> | | | <i>C. gracilis</i> | | | <i>T. chuii</i> | | |
| | | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES |
| 72 | IC ₅ | -0,61 | 1,43 | 3,03 | 0,33 | 1,29 | 1,85 | -2,21 | 3,30 | 11,74 | -0,05 | 0,72 | 1,61 | 0,12 | 0,67 | 5,31 |
| | IC ₂₅ | 1,85 | 2,96 | 3,59 | 1,82 | 2,32 | 2,64 | -0,19 | 8,37 | 13,47 | 1,10 | 1,41 | 1,68 | -1,88 | 3,92 | 12,12 |
| | IC ₅₀ | 3,11 | 3,74 | 4,25 | 2,94 | 3,28 | 3,67 | 8,56 | 12,29 | 14,35 | 1,71 | 2,04 | 2,49 | (**) | 13,30 | (*) |
| | IC ₇₅ | 3,70 | 4,73 | 5,16 | 3,65 | 4,25 | 4,50 | 12,49 | 14,65 | 18,17 | 3,01 | 3,18 | 3,33 | | | |
| | IC ₉₅ | 5,61 | 5,77 | 6,02 | 4,72 | 4,85 | 4,90 | 14,38 | 16,58 | 18,78 | 3,79 | 3,84 | 3,91 | | | |
| 96 | IC ₅ | -0,33 | 1,25 | 3,38 | 0,98 | 1,49 | 2,68 | -2,06 | 3,14 | 12,46 | -0,69 | 1,95 | 2,09 | 0,11 | 0,84 | 5,60 |
| | IC ₂₅ | 2,36 | 3,31 | 3,88 | 2,02 | 2,60 | 3,08 | -3,53 | 9,43 | 14,78 | 2,19 | 2,38 | 2,47 | -4,97 | 6,28 | 10,43 |
| | IC ₅₀ | 3,76 | 4,31 | 4,66 | 3,17 | 4,08 | 4,58 | 11,12 | 14,58 | 18,01 | 2,61 | 2,79 | 2,95 | (**) | 18,20 | (*) |
| | IC ₇₅ | 4,59 | 5,10 | 5,56 | 4,49 | 4,91 | 5,62 | 14,22 | 17,40 | 20,22 | 3,06 | 3,34 | 3,53 | | | |
| | IC ₉₅ | 5,65 | 5,82 | 5,91 | 5,57 | 5,76 | 5,93 | (**) | 19,12 | | 3,80 | 3,90 | 4,01 | | | |

Método *bootstrap*. Valores medios; ICEI: Intervalo de confianza expandido inferior; ICEI: Intervalo de confianza expandido superior

(*) No es posible calcular la interpolación lineal

(**) No es posible calcular los límites de confianza

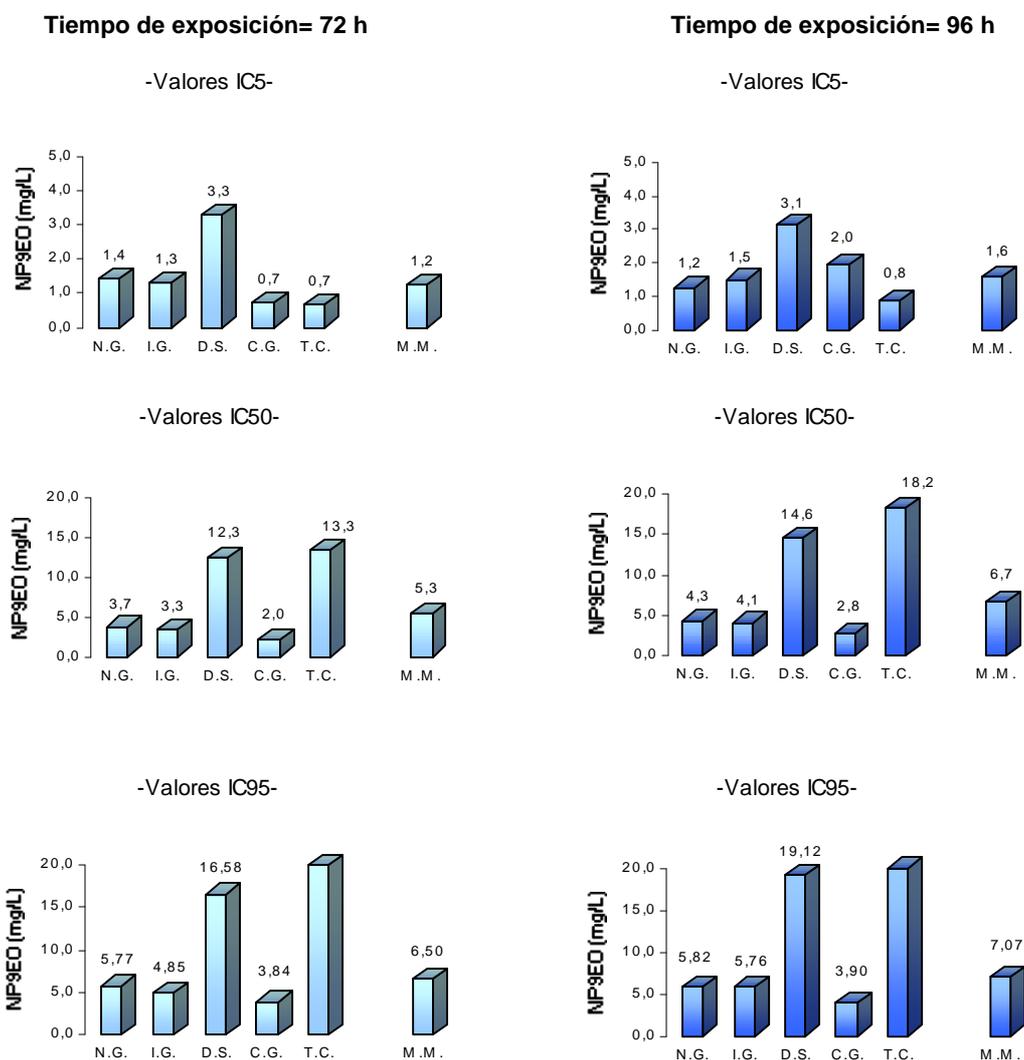
En las gráficas mostradas en la Figura C III.23. se representan los valores de IC₅, IC₅₀ e IC₉₅ a las 72 y 96 h de exposición obtenidos en los ensayos del NP9EO y las cinco especies de microalgas de ensayo. La última columna de cada gráfico representa la media geométrica de los valores de *ICp* obtenidos para cada microalga. En la Figura C III.24. se representa una clasificación de las algas en función de la sensibilidad a este tóxico.

Respecto a los resultados obtenidos en este apartado hay que destacar las amplias diferencias en las concentraciones obtenidas para cada nivel de efecto calculado entre las especies de ensayo. Por ejemplo, para las 72 horas de exposición las concentraciones que causan un 5% de inhibición respecto a la población control (IC₅) oscilan entre 0,67 mg/L obtenida para *T. chuii* y 3,30 mg/L obtenida para *D. salina*. Las concentraciones IC₅₀ oscilan entre 2,04 mg/L de *C. gracilis* y 13,30 mg/L para *T. chuii*. Por último, las IC₉₅ oscilan entre 3,84 mg/L de *C. gracilis* y superior a 20 mg/L para *T. chuii*.

A las 96 horas de exposición se observa un incremento en las concentraciones calculadas para los diferentes niveles de efecto de todas las algas significando por tanto, una adaptación de las algas al tensioactivo.

Otra cuestión importante que se observa en el conjunto de resultados es la clasificación de las algas que se realiza conforme a su sensibilidad al tóxico. El alga *T. chuii* es la que presenta un espectro de respuestas más amplio frente a diferentes concentraciones de tóxico. A bajas concentraciones del tensioactivo es el alga más afectada, sin embargo se muestra posteriormente como la más resistente de todas (IC₉₅ > 20 mg/L). El alga más sensible respecto a las concentraciones IC₅₀ e IC₉₅ a las 72 y 96 horas de exposición es *C. gracilis*.

Ensayo de toxicidad del NP9EO



N.G.: *N. gaditana*; I.G.: *I. galbana*; D.S.: *D. salina*; C.G.: *C. gracilis*; T.C.: *T. chuii*; M.M.: Microalgas Marinas (valores correspondiente a la media geométrica de los valores obtenidos para las cinco algas de ensayo)

Figura C III.23. Resultados de IC₅, IC₅₀ e IC₉₅ del ensayo de toxicidad del NP9EO con 5 microalgas marinas para periodos de exposición de 72 y 96 horas

| | | <u>IC5</u> | <u>IC50</u> | <u>IC95</u> |
|------|----------------|-------------|-------------|-------------|
| 72 h | + sensibilidad | T. chuii | C. gracilis | C. gracilis |
| | ↑ | C. gracilis | I. galbana | I. galbana |
| | | I. galbana | N. gaditana | N. gaditana |
| | ↓ | N. gaditana | D. salina | D. salina |
| | - sensibilidad | D. salina | T. chuii | T. chuii |
| | | <u>IC5</u> | <u>IC50</u> | <u>IC95</u> |
| 96 h | + sensibilidad | T. chuii | C. gracilis | C. gracilis |
| | ↑ | N. gaditana | I. galbana | I. galbana |
| | | I. galbana | N. gaditana | N. gaditana |
| | ↓ | C. gracilis | D. salina | D. salina |
| | - sensibilidad | D. salina | T. chuii | T. chuii |

Figura C III.24. Sensibilidad de las especies de microalgas frente al tensioactivo no iónico NP9EO

Respecto a la comparación de resultados con datos bibliográficos (Anexo III), existen varias referencias de toxicidad con algas de agua dulce, pero ninguna con algas de agua de mar. Para microalgas de agua dulce, en concreto para *Selenastrum capricornotum* se ha estimado una IC_{50} a las 96 horas de exposición que oscila entre 12 y 50 mg/L de NP9EO (Dorn *et al.*, 1993; Naylor, 1995) resultados que son comparables a los obtenidos con *D. salina* (14,58 mg/L) y *T. chuii* (18,20 mg/L).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Los resultados obtenidos para las cinco microalgas son los siguientes:

| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> |
|----------------------------|--------------------|-------------------|--|--------------------|--|
| Concentración alguistática | 9 mg/L | 7 mg/L | 20 mg/L | 8 mg/L | 20 mg/L |
| Concentración alguicida | 10 mg/L | 8 mg/L | No se ha determinado experimentalmente | 9 mg/L | No se ha determinado experimentalmente |

Para las algas *D. salina* y *T. chuii* se produjo un aumento de la concentración de biomasa de todos los cultivos, por tanto, se define la concentración alguistática como la mayor concentración ensayada para cada alga.

CONSIDERACIONES ADICIONALES SOBRE LOS VALORES NOEC, IC_p Y ALGUICIDAS

Para el nivel de efecto umbral existen algunos resultados los cuales hay que interpretarlos con precaución. Estos son los siguientes:

- ⊗ Valores de IC_5 de *N. gaditana* a las 72 y 96 h.
- ⊗ Valores de IC_5 de *I. galbana* a las 96 h.
- ⊗ Valores de IC_5 e IC_{25} de *D. salina* a las 72 y 96 h.
- ⊗ Valores de IC_5 de *C. gracilis* a las 72 h.
- ⊗ Valores de IC_5 e IC_{25} de *T. chuii* a las 72 h.
- ⊗ Valores de IC_5 de *T. chuii* a las 96 h.

Para el nivel de efecto alguicida no hay que realizar ninguna consideración en este apartado.

4.1.2.2. ENSAYOS CON CRUSTÁCEOS. ARTEMIA

En este apartado se muestran los resultados de toxicidad obtenidos para *Artemia* expuesta a diversas concentraciones de NP9EO.

| <u>Especie</u> | <u>Concentración de NP9EO (mg/L)</u> | | | | | | | | | | |
|-----------------------|--------------------------------------|-----|-----|------|------|------|------|------|------|-------|-------|
| <i>Artemia salina</i> | 0,0 | 3,1 | 7,6 | 15,3 | 30,6 | 45,9 | 61,2 | 76,6 | 91,9 | 107,0 | 122,5 |

La siguiente gráfica muestra una representación de los porcentajes de supervivientes obtenidos en cada periodo de ensayo.

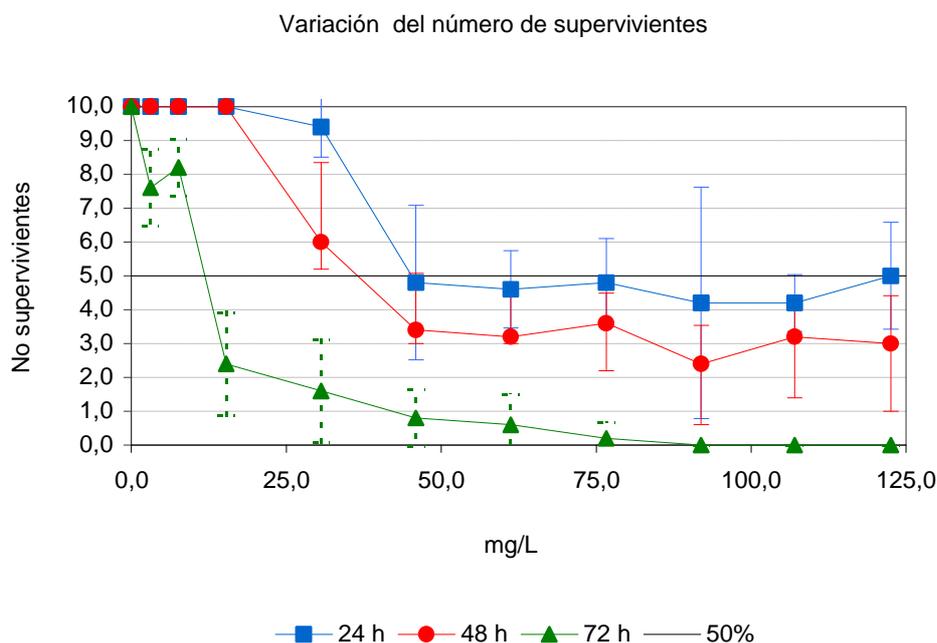


Figura C III.25. Variación del número de supervivientes del ensayo de toxicidad del NP9EO y *Artemia*

DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES

Como se puede observar en el gráfico, las primeras concentraciones de tóxico y el control no presentaron mortalidad en ninguno de los 5 replicados de cada concentración. Tal y como se explicó para el compuesto LAS, este hecho es muy importante y condiciona todo el cálculo de las concentraciones de efectos umbrales al presentar valores de varianza igual a cero. Así pues y siguiendo las mismas pautas y consideraciones que se realizaron con el compuesto LAS, mediante observación visual se determinan las siguientes concentraciones de efectos umbrales.

Para el ensayo de toxicidad aguda de *Artemia* y el NP9EO se establece la concentración de efectos mínimos observados en 30,6 mg/L a las 24 y 48 horas de ensayo, y por tanto, la concentración de no efecto se corresponde con 15,3 mg/L.

DETERMINACIÓN DE LAS EC(p)

Método de interpolación gráfica

Mediante el método de interpolación gráfica, se han determinado los valores de LC₅₀ para cada periodo de exposición. Los resultados fueron los siguientes:

| NP9EO (mg/L) | 24 h | 48 h | 72 h |
|------------------|------|------|------|
| LC ₅₀ | 45,2 | 36,5 | 27,3 |

Método Probit

Las siguiente tabla muestras los valores medios para diversos LC(p) obtenidos mediante el método Probit.

Tabla CIII.26. Resultados de diferentes LC(p) obtenidos mediante el método Probit

| | 24 h | 48 h | 72 h |
|-------------|---------|---------|---------|
| LC/EC 1,00 | 8,146 | 5,371 | 1,080 |
| LC/EC 5,00 | 15,818 | 10,370 | 2,105 |
| LC/EC 10,00 | 22,533 | 14,727 | 3,005 |
| LC/EC 15,00 | 28,611 | 18,661 | 3,820 |
| LC/EC 50,00 | 78,503 | 50,757 | 10,539 |
| LC/EC 85,00 | 215,401 | 138,060 | 29,078 |
| LC/EC 90,00 | 273,501 | 174,937 | 36,969 |
| LC/EC 95,00 | 389,603 | 248,436 | 52,764 |
| LC/EC 99,00 | 756,536 | 479,656 | 102,828 |

χ^2 calculado (24 h)=31,608; χ^2 calculado (48 h)= 28,254; χ^2 calculado (72 h)= 16,317; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados hay que interpretarlos con precaución (Notación del programa Probit)

La siguiente gráfica representa estos valores y sus límites de confianza.

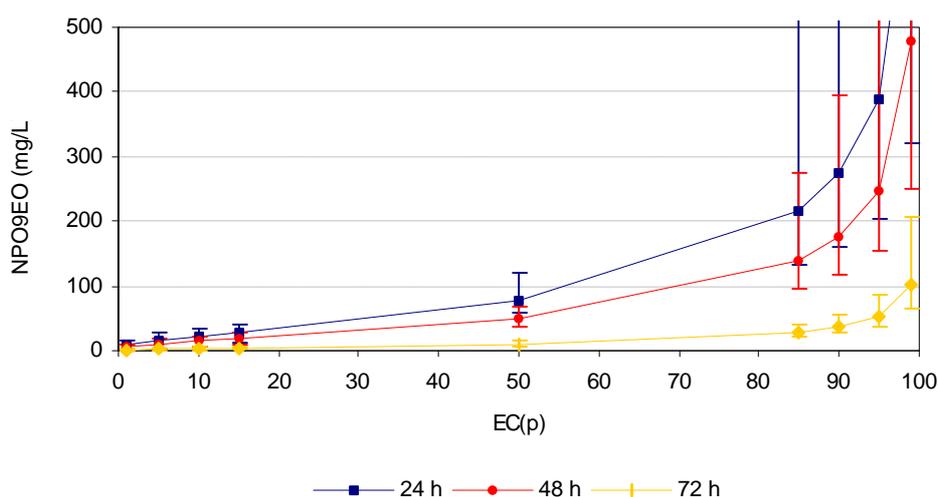


Figura C III.26. Valores de EC(p) calculados mediante el método Probit

Tal y como cabría esperar, a medida que transcurre el ensayo, el crustáceo presenta una mayor toxicidad al compuesto. Dicho de otra forma, para un determinado efecto, cuanto mayor es el tiempo de exposición, menor es la concentración de tóxico que causa ese efecto.

A las 24 horas y 48 horas de exposición, las concentraciones y los límites de confianza obtenidos mediante el método Probit son extremadamente elevados y muy diferentes a las concentraciones ensayadas para niveles de efecto mayores o iguales al 50%. Esto es debido a que las concentraciones de ensayo más altas presentan un porcentaje importante de supervivientes (p.e. la concentración de 122,5 mg/L de tensioactivo presentan un 50 y 30% de supervivientes a las 24 y 48 horas respectivamente). El programa presenta una rutina mediante la cual se realizan extrapolaciones sucesivas con el objeto de estimar las concentraciones que producen porcentajes de efecto superiores a las obtenidas experimentalmente. Así, las concentraciones que producen más de un 85% de mortalidad respecto al control son de 215,4 mg/L a las 24 h y de 138,1 mg/L a las 48 horas de exposición. A medida que el programa estima la concentración para un porcentaje de efecto más elevado, aumenta el valor de la concentración y consecuentemente los límites de confianza.

A las 72 horas de exposición, las concentraciones más altas de ensayo presentan unos porcentajes muy bajos de supervivientes (6% de supervivientes para la concentración de 122,5 mg/L) por lo tanto, las concentraciones estimadas se encuentran dentro del rango de concentraciones experimental, y los límites de confianza son muy estrechos.

Las LC_{50} obtenidas mediante interpolación gráfica fueron 45,2, 36,5 y 27,3 mg/L para las 24, 48 y 72 horas de exposición respectivamente. Las LC_{50} obtenidas mediante el método Probit son 78,5 mg/L a las 24 horas, 50,8 mg/L a las 48 horas y finalmente, 10,5 mg/L a las 72 horas de exposición. Para este ensayo, vemos como existen diferencias significativas entre los valores obtenidos mediante ambas técnicas de cálculo.

No se han encontrado referencias bibliográficas relativas a la toxicidad de este tensioactivo en *Artemia*. Respecto a otro tipo de crustáceos, se han encontrado valores bibliográficos en el rango de 14 a 2,9 para *Daphnia*. Para el anfípodo *Mysidopsis bahia* se han determinado varias LC_{50} a las 48 horas de exposición las cuales oscilan en el rango de 0,9 a 2,0 mg/L (Hall *et al.*, 1989; Patoczka y Pulliam, 1990), y para peces, el rango de LC_{50} está entre 1,6 a 46. En el presente trabajo, los niveles encontrados son superiores a las referencias bibliográficas encontradas para crustáceos marinos, sin embargo, son comparables con los resultados obtenidos con otros tipos de organismos (Anexo III).

4.1.2.3. ENSAYOS CON BACTERIAS MARINAS. *VIBRIO FISCHERI*

Las concentraciones de ensayo utilizadas para la realización de esta prueba fueron las siguientes:

| <u>Especie</u> | <u>Concentración de NP9EO (mg/L)</u> | | | | | | | |
|------------------------|--------------------------------------|-----|------|------|------|------|-------|-------|
| <i>Vibrio fischeri</i> | 0,0 | 5,8 | 11,6 | 23,1 | 46,5 | 92,5 | 185,0 | 370,0 |

Para esta prueba, el control de calidad del ensayo mostró una inhibición de la luminiscencia al cabo de los 30 minutos de exposición del 41,6% respecto al control de CIna al 2%.

Si bien este porcentaje se encuentra en el límite de aceptabilidad, los resultados obtenidos en este ensayo deben interpretarse con precaución.

Para calcular el valor de las $EC(p)$ se linealizó la curva de inhibición de la bioluminiscencia convirtiendo los valores de porcentaje de inhibición en valores γ (EC_{50} para $\gamma=1$, EC_{25} para $\gamma=0,5$, y EC_5 para $\gamma=0,1$).

Para este compuesto, no fue posible determinar la EC_{50} y EC_{25} en el rango de concentraciones de ensayo. La dificultad que presenta el compuesto a la hora de preparar las disoluciones de ensayo, impidió fabricar disoluciones más concentradas de tergitol en agua de mar sintética. Además, en la gráfica se observa como a partir de cierta concentración, la respuesta se asintotiza por debajo del 20% de efecto.

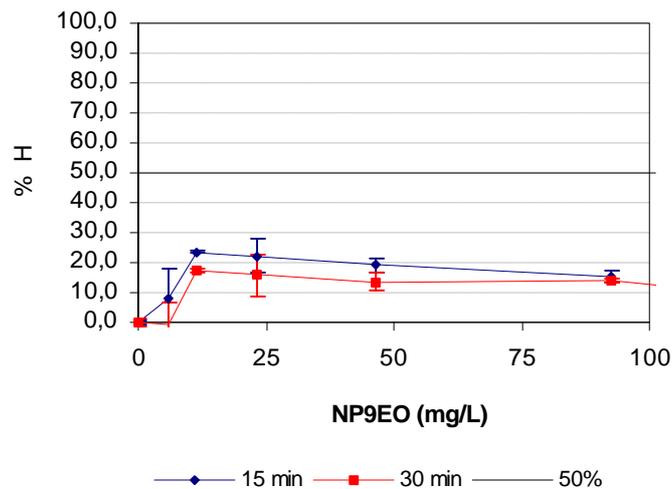


Figura C III.27. Variación de la inhibición del crecimiento con la concentración en el ensayo de toxicidad del NP9EO y *Vibrio fischeri*

Por tanto, sólo se ha podido calcular la concentración que se corresponde con un 5% de inhibición de la luminiscencia. Para $t=15$ minutos la $EC_{50}=17,9$ mg/L y para $t=30$ minutos la $EC_{50}=19,1$ mg/L de NP9EO.

Para los NP9EO, no se han encontrado referencias bibliográficas que permitan comparar las concentraciones obtenidas en este estudio. Las únicas referencias bibliográficas relativas a la toxicidad de este compuesto o similares utilizando bacterias marinas son las siguientes. Para el compuesto nonilfenol, Dorn *et al.* (1993) determinan la EC_{50} en el ensayo con *Photobacterium phosphoreum* en 60,6 mg/L. Knie *et al.* (1983) determinan la EC_{10} superior a 10 mg/L en el ensayo de consumo de oxígeno de *Pseudomonas putida*. Si bien son pocas las referencias, puede decirse que los niveles encontrados son comparables con los resultados bibliográficos.

4.1.2.4. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL ENSAYO DEL NP9EO

A partir de los resultados obtenidos con los tres taxones de ensayo se obtienen las siguientes conclusiones generales:

Resultados con microalgas:

- i) Los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad con cinco microalgas y el tensioactivo no-iónico NP9EO demuestra que el diseño experimental y las medidas de biomasa obtenidas en función de la turbidez de la muestra, permiten obtener un conjunto de resultados de toxicidad coherentes y en los rangos bibliográficos.
- ii) Los diferentes resultados obtenidos en cada nivel de efecto (umbral, inhibición parcial del crecimiento y niveles alguicidas) permiten afirmar que la toxicidad del NP9EO depende de la especie de ensayo.
- iii) La menor concentración de efecto observada es de 1 mg/L de NP9EO.
- iv) Se han obtenido resultados coherentes de IC_{50} con límites de confianza estrechos lo cual indica una buena precisión en los resultados. Las concentraciones de LC_{50} obtenidas a las 72 horas oscilan entre 2,04 y 13,30 mg/L, y a las 96 horas entre 2,79 y 18,20 mg/L de NP9EO.
- v) En función de la IC_{50} se obtiene una escala de sensibilidad al tóxico:

← + sensible al NP9EO
+ resistente al NP9EO →

T. chuii
D. salina
N. gaditana
I. galbana
C. gracilis

- vi) Ha sido posible calcular la concentración alguicida para varias algas. El menor valor ha sido de 8 mg/L de NP9EO. Para otras especies, es necesario continuar los estudios al objeto de estimar de forma más concluyente estas concentraciones.

Resultados con *Artemia*:

- vii) Los resultados obtenidos tanto en el control como en las concentraciones de ensayo permiten afirmar que el diseño experimental ha sido correcto obteniéndose resultados coherentes y dentro de los rangos bibliográficos de otros organismos acuáticos.
- viii) El nivel umbral de toxicidad para este compuesto se ha establecido en 15,3 mg/L.
- ix) Los resultados de LC₅₀ de *Artemia* presentan una gran dependencia con el tiempo de exposición. Los valores obtenidos entre los periodos de 24 a 72 horas oscilan entre 78,50 y 10,54 respectivamente.

Resultados con *Vibrio fischeri*:

- x) El ensayo realizado no permite determinar la EC₅₀, por tanto, es necesario realizar más estudios al objeto de determinar correctamente la toxicidad en el ensayo de bacterias luminiscentes.

Resultados comparativos:

- xi) En general las algas presentan niveles umbrales más bajos que *Artemia* y *Vibrio fischeri*.
- xii) Respecto a la IC₅₀ (72 h) y EC₅₀ (72 h), la *Artemia* presenta un comportamiento intermedio al obtenido en las algas. En la clasificación anteriormente realizada se situaría entre *N. gaditana* y *D. salina*.
- xiii) El crustáceo fue el organismo que presentó una mayor resistencia al tensioactivo NP9EO.

4.1.3. TOXICIDAD DEL FENOL

En este apartado se resumen y comentan los resultados más relevantes obtenidos en los ensayo de toxicidad con fenol. En el Anexo IV del presente documento, se encuentran detallados las condiciones de ensayo, mediciones de biomasa, cálculos realizados, así como otro tipo de información complementaria (propiedades físicas y químicas del compuesto y referencias ecotoxicológicas obtenidas de la bibliografía).

4.1.3.1. ENSAYOS CON MICROALGAS MARINAS

Las concentraciones de ensayo seleccionadas para este compuesto fueron las siguientes:

| <u>Especies</u> | <u>Concentración de fenol (mg/L)</u> | | | | | | | | | | |
|--------------------|--------------------------------------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Microalgas marinas | 0,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 300,0 | 350,0 | 400,0 | 450,0 | 500,0 |

Al comienzo del ensayo, y cada 24 horas de exposición, se realizaron medidas de concentración de biomasa. Una vez terminado el ensayo, estas medidas se normalizaron tal y como se describió en el apartado 4.1.1.1. del presente capítulo.

En la figura C III.28. se muestra la evolución temporal de la concentración de biomasa normalizada.

Las curvas de crecimiento obtenidas en estos ensayos muestran una amplia gama de respuestas de las poblaciones expuestas a diversas concentraciones de fenol.

A priori, y según la forma que toman las diferentes curvas puede decirse que el alga *N. gaditana* es la que presenta una mayor sensibilidad a este compuesto. Observando la gráfica se puede apreciar como la concentración de 50 mg/L presenta un comportamiento similar a la población control, la población expuesta a 100 mg/L de fenol presenta una inhibición parcial en su crecimiento. El resto de concentraciones de ensayo muestran un crecimiento neto prácticamente nulo. Hay que resaltar que a pesar de esta gran inhibición, no se obtienen valores negativos de concentración de biomasa normalizada, es decir, las algas se encuentran muy inhibidas pero no se aprecia una mortalidad significativa en la población.

Como ya se ha comentado el resto de microalgas presentan una amplia gama de respuestas al tóxico. Un aspecto interesante es el hecho de que para todas las algas y prácticamente en todo el rango de concentraciones, no se observan valores negativos de concentración de biomasa normalizada. Las gráficas muestran como a altas concentraciones de fenol las poblaciones se encuentran muy inhibidas y sólo en las más altas concentraciones de tóxico y en los períodos de exposición más elevados, se muestra una ligera mortalidad en la población. Esta mortalidad se acentúa algo más en el alga *I. galbana* mostrándose como la más sensible a altas concentraciones de tóxico.

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo

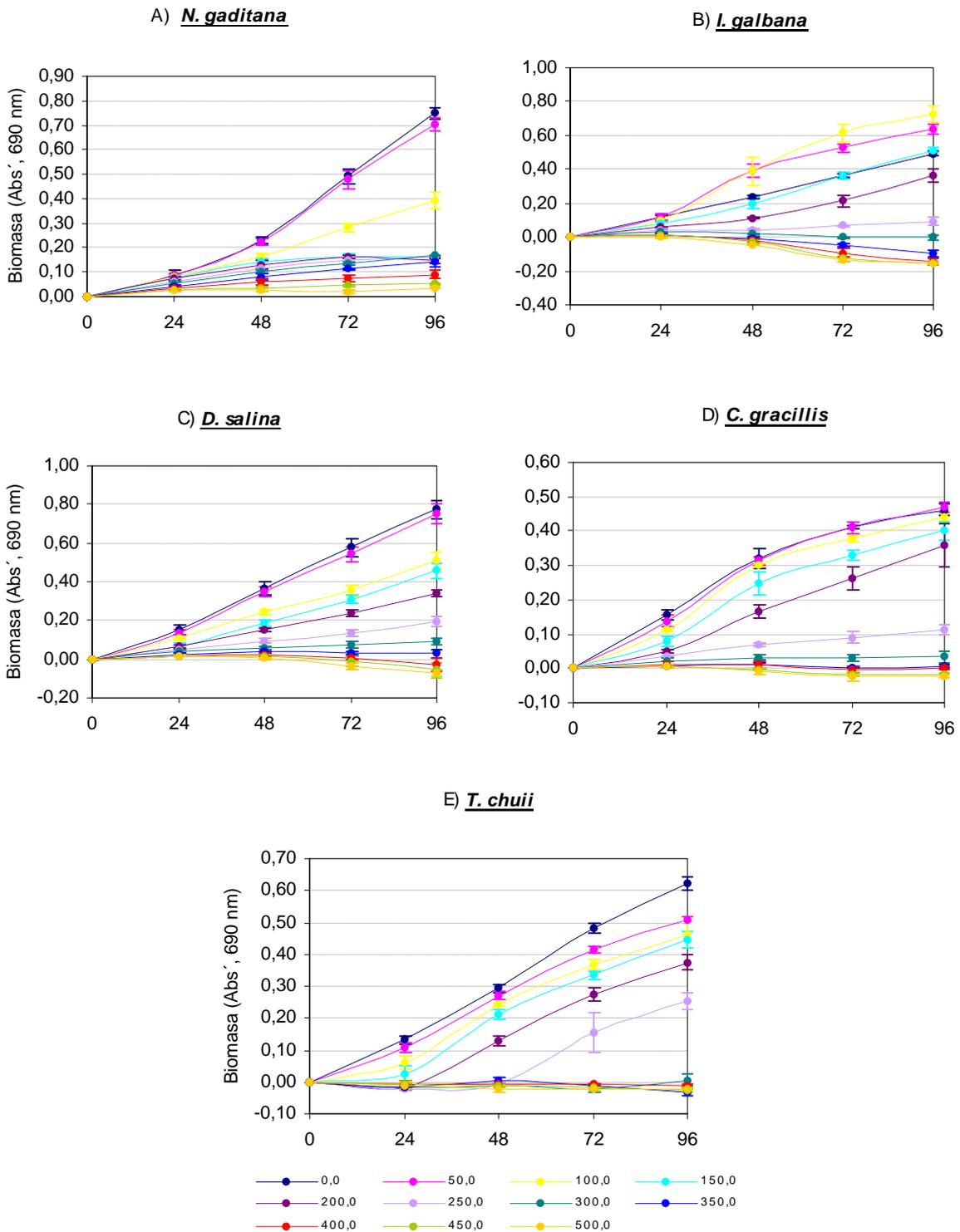


Figura C III.28. Evolución de la concentración de biomasa normalizada en el ensayo de toxicidad del FENOL y microalgas marinas

En la figura C III.29. se muestran las curvas dosis-respuesta para cada periodo de exposición.

Observando las curvas correspondientes a las 72 y 96 horas de exposición, se puede apreciar como para este compuesto, las microalgas muestran dos tipos de comportamiento.

Por una parte, para las algas *N. gaditana*, *D. salina*, *C. gracilis* y *T. chuii* se observa la forma sigmoideal descrita en apartados anteriores. Hay que notar que el extremo superior de éstas está formado por los controles y la concentración más baja ensayada (50 mg/L), presentando esta última valores de biomasa ligeramente inferiores. Esto indica que la selección de la concentración inferior de ensayo está muy ajustada en torno a los niveles umbrales, pudiendo condicionar la obtención estadística de los niveles umbrales. Respecto al extremo inferior, sólo *D. salina* muestra una mortalidad parcial de la población a partir de los 400 mg/L de fenol. El resto de microalgas muestra valores de concentración de biomasa normalizada en torno a cero.

Las curvas de *I. galbana* muestran un comportamiento similar al resto de algas ensayadas excepto en su extremo superior. Para este alga, se observan como las poblaciones expuestas a concentraciones de 50 y 100 mg/L presentan un crecimiento significativamente superior a la población control. Este efecto es lo que se ha denominado por diversos autores como un sobrecrecimiento o estimulación del crecimiento (Lewis, 1994; Rand, 1995). El sobrecrecimiento se observa claramente a partir del periodo de 48 horas de exposición y se aprecia con mayor magnitud en la concentración de 100 mg/L. La concentración de 150 mg/L de fenol comienza a afectar al alga y disminuye el efecto de estimulación respecto al control mostrando valores similares a éste. A partir de esta concentración, se obtiene la forma habitual de las curvas dosis-respuesta.

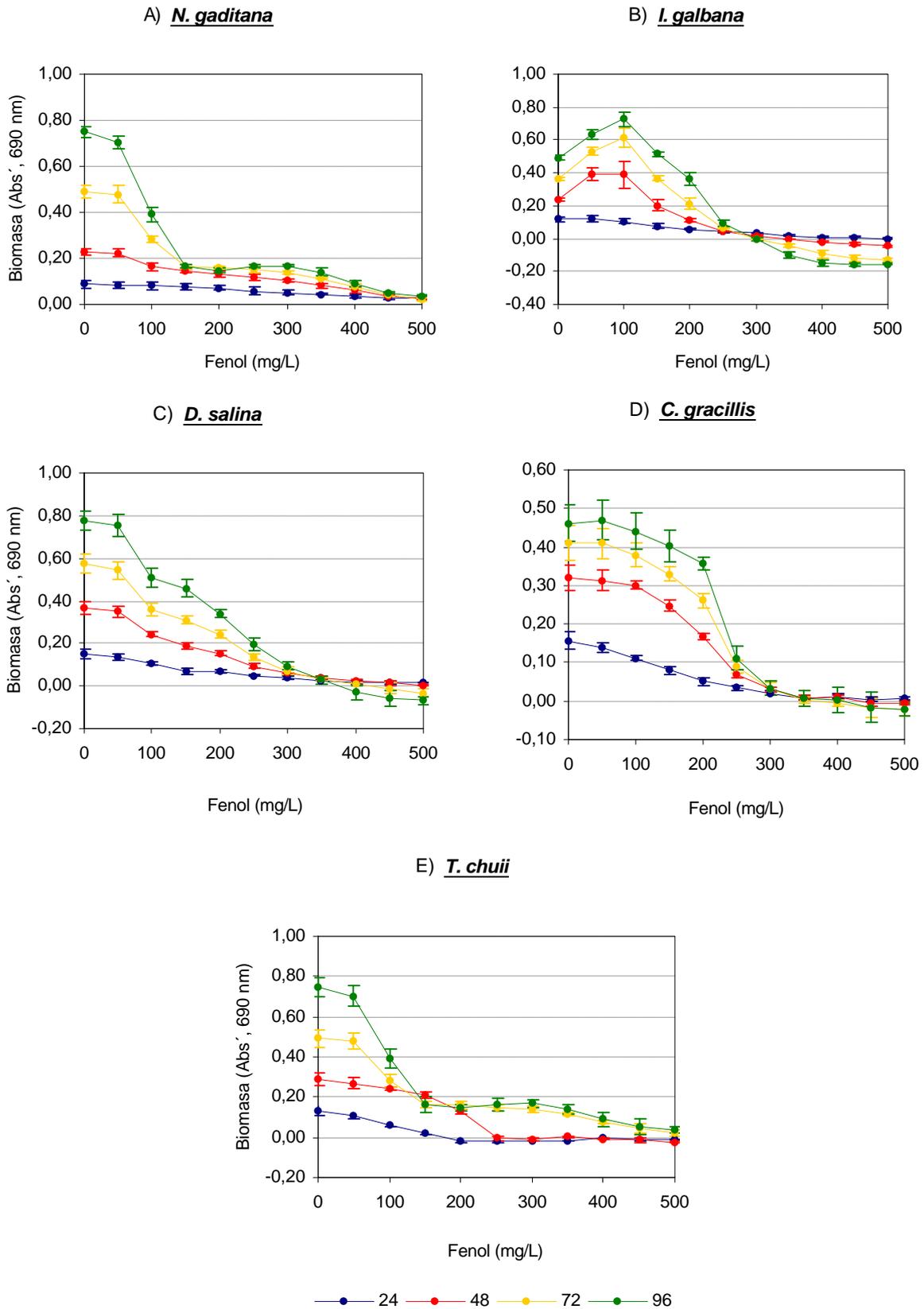


Figura C III.29. Variación de la concentración de biomasa normalizada con la concentración de FENOL

OBTENCIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES

Se ensayó la normalidad de la distribución de resultados de crecimiento mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza mediante el test de Barlett. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla C III.27. *W* calculados del ensayo de FENOL y microalgas marinas. Test de Shapiro Wilk

| Periodo de exposición | Test de Shapiro Wilk. <i>W</i> calculados | | | | | <i>W</i> crítico para N=33 y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|---|--------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracillis</i> | <i>T. chunii</i> | |
| 24 h | 0,976 | 0,939 | 0,951 | 0,960 | 0,977 | 0,931 |
| 48 h | 0,955 | 0,849 | 0,948 | 0,951 | 0,979 | |
| 72 h | 0,949 | 0,966 | 0,983 | 0,964 | 0,965 | |
| 96 h | 0,963 | 0,988 | 0,964 | 0,964 | 0,973 | |
| | Normalidad para todos los t | Normalidad excepto para t=48 h | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | |

Los resultados indican el cumplimiento de la condición de normalidad excepto para *I. galbana* a las 48 horas. Esta falta de normalidad está producida por las concentraciones de fenol que producen una estimulación del crecimiento respecto al control. Realizando el test de normalidad para el conjunto de tratamientos excepto para los correspondientes a 50, 100 y 150 mg/L se obtendría la condición de normalidad (*W* calculado=0,967; *W* crítico (N=24; $\alpha=0,05$)=0,916).

Tabla C III.28. *B* calculados del ensayo de FENOL y microalgas marinas. Test de Barlett

| Periodo de exposición | Test de Barlett. <i>B</i> calculados | | | | | <i>B</i> crítico para 10 grados de libertad y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|--------------------------------------|----------------------------------|------------------|---------------------|------------------|---|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracillis</i> | <i>T. chunii</i> | |
| 24 h | 6,32 | 15,75 | 11,59 | 14,01 | 17,33 | 18,31 |
| 48 h | 4,35 | 34,34 | 14,99 | 13,37 | 15,51 | |
| 72 h | 15,67 | 16,04 | 9,48 | 16,43 | 17,63 | |
| 96 h | 16,72 | 12,26 | 5,29 | 17,30 | 16,33 | |
| | Homogeneidad | Homogeneidad excepto para t=48 h | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | |

Los resultados indican en todos los casos homogeneidad de la varianza excepto para *I. galbana* a las 48 horas. Realizando el test de Barlett para el conjunto de tratamientos excepto para los correspondientes a 50, 100 y 150 mg/L se obtendría la condición de homogeneidad (*B* calculado=7,10; *B* crítico (N=24; $\alpha=0,05$)=14,07).

Los resultados obtenidos de la aplicación del test de Dunnett fueron los siguientes:

Tabla C III.29. t calculados del ensayo de FENOL y microalgas marinas (t=72 h). Método de Dunnett

| mg/L FENOL | Test de Dunnet. Valores de t -calculados | | | | | T crítica para 22 grados de libertad y 10 concentraciones |
|------------|--|-------------------|------------------|---------------------|-----------------|---|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracillis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 50,0 | 0,93 | -7,46 (**) | 1,76 | 0.14 | 6,32 (*) | 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 100,0 | 15,33 (*) | -10,92 (**) | 10,92 (*) | 2.66 (*) | 10,76 | |
| 150,0 | 23,96 | -0,19 | 13,18 | 6.89 | 13,76 | |
| 200,0 | 24,25 | 7,50 (*) | 16,60 | 12.57 | 19,36 | |
| 250,0 | 24,98 | 15,80 | 21,82 | 27.07 | 29,78 | |
| 300,0 | 25,91 | 20,07 | 24,95 | 31.86 | 47,26 | |
| 350,0 | 27,69 | 22,96 | 26,81 | 34.35 | 46,17 | |
| 400,0 | 30,59 | 26,25 | 28,06 | 34.86 | 45,82 | |
| 450,0 | 32,71 | 28,22 | 29,04 | 36.06 | 46,76 | |
| 500,0 | 34,27 | 29,12 | 30,11 | 36.43 | 47,17 | |

Tabla C III.30. t calculados del ensayo de FENOL y microalgas marinas (t=96 h). Método de Dunnett

| mg/L FENOL | Test de Dunnet. Valores de t -calculados | | | | | T crítica para 22 grados de libertad y 10 concentraciones |
|------------|--|-------------------|------------------|---------------------|-----------------|---|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracillis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 50,0 | 3,40 (*) | -7,32 (**) | 0,78 | -0.66 | 6,80 (*) | 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 100,0 | 26,48 | -11,88 (**) | 9,38 (*) | 1.65 | 9,64 | |
| 150,0 | 43,21 | -1,14 | 11,18 | 4.81 (*) | 10,59 | |
| 200,0 | 44,59 | 6,59 (*) | 15,24 | 6.51 | 14,90 | |
| 250,0 | 43,26 | 20,41 | 20,30 | 27.58 | 22,02 | |
| 300,0 | 42,94 | 25,28 | 23,84 | 33.75 | 36,98 | |
| 350,0 | 45,05 | 30,14 | 26,12 | 35.93 | 39,10 | |
| 400,0 | 48,72 | 32,68 | 28,13 | 36.25 | 38,00 | |
| 450,0 | 51,55 | 33,22 | 29,05 | 37.67 | 38,80 | |
| 500,0 | 52,71 | 33,05 | 29,48 | 38.17 | 38,54 | |

Los resultados señalados con un asterisco representan el umbral de toxicidad, esto es la LOEC. Para este ensayo, los resultados señalados con doble asterisco indican un sobrecrecimiento estadísticamente significativo respecto a los controles de ensayo.

Las concentraciones de 50 y 100 mg/L de fenol producen una estimulación en el crecimiento de las poblaciones de *I. galbana*. Observando el signo negativo de la t calculada para la concentración de 150 mg/L puede decirse que esta concentración presenta un crecimiento superior a la población control, sin embargo no es estadísticamente significativo para el nivel de confianza preestablecido ($\alpha=0,05$).

El objeto de este estudio no es determinar las concentraciones de compuesto que generan una estimulación en el crecimiento de las microalgas marinas. En el caso de que así fuera, el tratamiento estadístico debería hacerse de forma más rigurosa, en el sentido de la selección del tipo de prueba t que determina un crecimiento "diferente" respecto al control. Hasta ahora se ha seleccionado la prueba de una cola puesto que presuponemos que la variabilidad se va a producir en un único sentido, es decir, esperamos que se produzca un efecto de inhibición en el crecimiento. En el caso de que no sepamos el sentido del efecto (inhibición o estimulación), la prueba a priori seleccionada debería ser una prueba t de dos colas. Por estas razones se ha realizado el test de una cola, y si bien se indican las concentraciones que producen el efecto de estimulación, no se utilizará este efecto para el posterior cálculo de los estándares de calidad ambiental.

La siguiente tabla muestra un resumen de los resultados umbrales obtenidos:

Tabla C III.24. Valores NOEC y LOEC obtenidos en el ensayos del FENOL y las microalgas marinas

| 72 h | Microalgas Marinas | | | | |
|------|--------------------|-------------------|------------------|---------------------|-----------------|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracillis</i> | <i>T. chuii</i> |
| NOEC | 50,0 | 150,0 | 50,0 | 50,0 | No determinado |
| LOEC | 100,0 | 200,0 | 100,0 | 100,0 | 50 |
| 96 h | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracillis</i> | <i>T. chuii</i> |
| NOEC | No determinado | 150,0 | 50,0 | 100,0 | No determinado |
| LOEC | 50,0 | 200,0 | 100,0 | 150,0 | 50 |

Respecto a los efectos umbrales, el alga más sensible a las 72 y 96 horas de exposición es *T. chuii* determinándose mediante el test de Dunnett una LOEC de 50 mg/L y por tanto y al ser ésta la menor concentración ensayada, no es posible determinar la concentración NOEC. El alga más resistente respecto a los efectos umbrales es *I. galbana* mostrando para ambos periodos de exposición valores de LOEC de 200 mg/L y de NOEC de 150 mg/L de fenol.

DETERMINACIÓN DE LOS IC_p

Los resultados de los valores medios de los IC_p calculados para cada una de las algas se muestra en la tabla siguiente.

Tabla C III.31. IC_p calculados en el ensayo de FENOL y microalgas marinas

| t (h) | Expresión de toxicidad | Valores de IC _p | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|------------------------|----------------------------|--------|--------|-------------------|--------|--------|------------------|--------|--------|---------------------|--------|--------|-----------------|--------|--------|
| | | <i>N. gaditana</i> | | | <i>I. galbana</i> | | | <i>D. salina</i> | | | <i>C. gracillis</i> | | | <i>T. chuii</i> | | |
| | | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES |
| 72 | IC ₅ | -4,74 | 48,56 | 59,87 | 106,93 | 109,33 | 112,73 | -9,60 | 40,48 | 76,01 | 48,58 | 78,92 | 103,49 | 11,81 | 18,17 | 27,18 |
| | IC ₂₅ | 62,27 | 77,23 | 86,06 | 134,20 | 146,45 | 162,55 | 55,93 | 79,07 | 98,12 | 147,04 | 165,66 | 197,73 | 71,61 | 108,92 | 150,81 |
| | IC ₅₀ | 98,71 | 114,65 | 126,95 | 172,91 | 187,69 | 209,49 | 121,08 | 164,30 | 198,34 | 202,11 | 215,65 | 226,98 | 197,55 | 215,07 | 241,03 |
| | IC ₇₅ | 294,93 | 328,01 | 358,87 | 218,47 | 229,42 | 238,40 | 230,07 | 245,29 | 263,90 | 238,49 | 246,05 | 262,36 | 220,18 | 260,09 | 284,12 |
| | IC ₉₅ | (*) | 491,96 | (*) | 278,88 | 280,82 | 282,61 | 330,67 | 257,50 | 379,55 | 295,84 | 318,64 | 336,49 | 280,50 | 291,90 | 296,81 |
| 96 | IC ₅ | 6,60 | 40,81 | 68,43 | 106,90 | 109,31 | 112,85 | -8,70 | 49,32 | 64,38 | 54,45 | 95,34 | 133,38 | 10,22 | 13,81 | 17,84 |
| | IC ₂₅ | 64,08 | 72,59 | 80,94 | 134,32 | 146,38 | 160,55 | 66,90 | 84,63 | 104,93 | 139,88 | 198,09 | 218,32 | 50,28 | 103,31 | 216,88 |
| | IC ₅₀ | 91,22 | 103,38 | 114,64 | 172,69 | 187,71 | 211,57 | 147,53 | 177,78 | 200,01 | 205,93 | 224,79 | 234,72 | 210,26 | 226,36 | 243,16 |
| | IC ₇₅ | 140,90 | 144,92 | 148,94 | 217,41 | 229,23 | 237,87 | 231,42 | 250,54 | 273,98 | 244,21 | 249,41 | 263,98 | 262,65 | 269,96 | 276,33 |
| | IC ₉₅ | (*) | 492,12 | (*) | 278,82 | 280,81 | 282,76 | 319,51 | 341,68 | 379,11 | 273,65 | 316,54 | 342,33 | 291,99 | 295,10 | 303,31 |

Método *bootstrap*. Valores medios; ICEI: Intervalo de confianza expandido inferior; ICES: Intervalo de confianza expandido superior

(*) No es posible calcular los intervalos de confianza

En las gráficas mostradas en la Figura C III.30. se representan los valores de IC₅, IC₅₀ e IC₉₅ a las 72 y 96 h de exposición obtenidos en los ensayos de fenol y las cinco especies de microalgas de ensayo. La última columna de cada gráfico representa la media geométrica de los valores de IC_p obtenidos para cada microalga. En la Figura C III.31. se representa una clasificación de las algas en función de la sensibilidad a este tóxico.

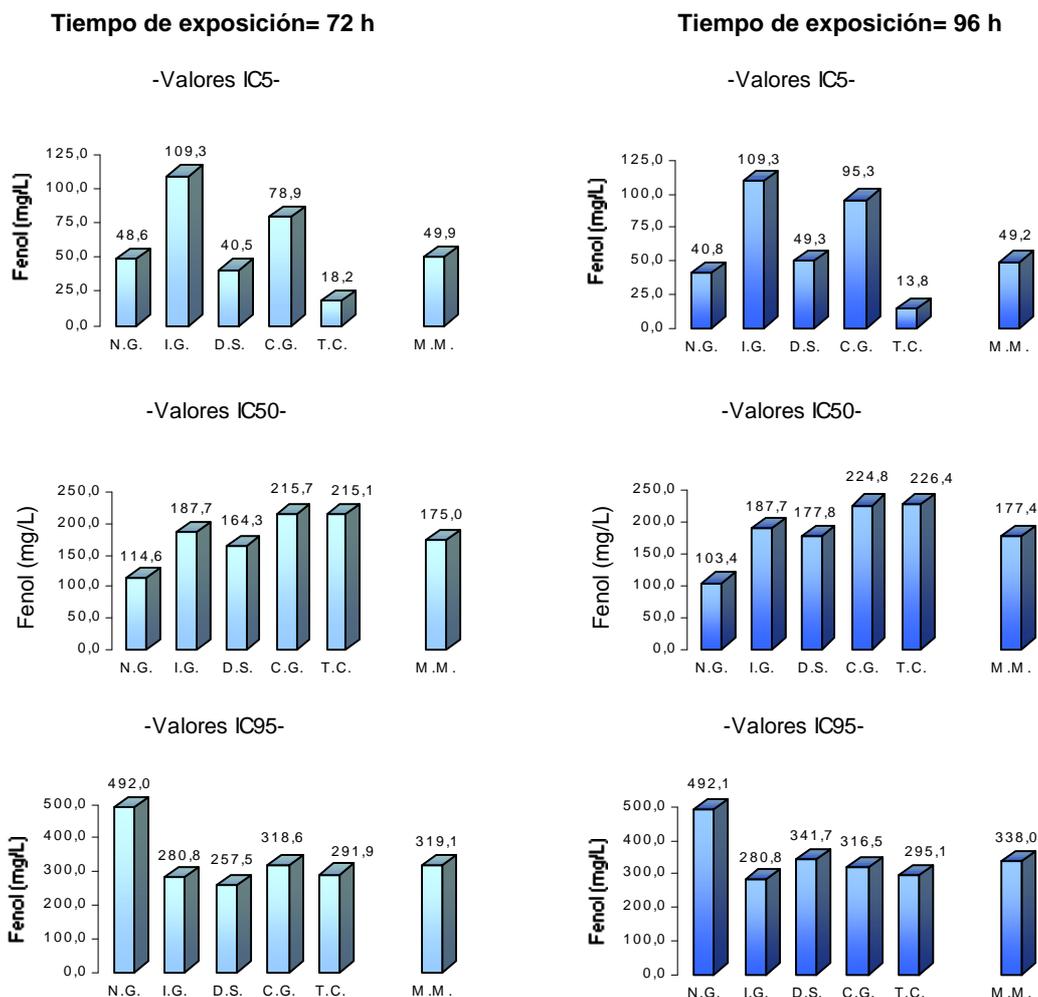
Respecto a los resultados obtenidos en este apartado hay que destacar los amplios rangos de concentraciones obtenidas para cada nivel de efecto calculado. Por ejemplo, a las 72 horas de exposición las concentraciones que causan un 5% de inhibición respecto a la población control (IC₅) oscilan entre 18,2 mg/L obtenida para *T. chuii* y 109,3 mg/L obtenida para *I. galbana*. Las concentraciones IC₅₀ oscilan entre 114,5 mg/L de *N. gaditana* y 215,7 mg/L para *C. gracillis*. Por último, las IC₉₅ oscilan entre 257,5 mg/L de *D. salina* y 492,0 mg/L para *N. gaditana*.

Respecto a la clasificación de las algas en función de su sensibilidad o su resistencia al tóxico no se observa una tendencia clara puesto que el orden depende del efecto y el periodo que estemos considerando. Por ejemplo a las 96 horas de exposición, *N. gaditana* es el alga que muestra una mayor sensibilidad según la LC₅₀ y aparece como la más resistente según la concentración LC₉₅.

Centrando la clasificación en los valores de LC₅₀, el alga *N. gaditana* es la más sensible a las 72 y 96 horas de exposición. Las algas más resistentes son *C. gracillis* y *T. chuii* presentando valores muy similares en ambos periodos de exposición.

Respecto a la comparación de resultados con datos bibliográficos (Anexo IV), si bien existe un gran número de referencias bibliográfica relativas a la toxicidad de este compuesto utilizando invertebrados o vertebrados acuáticos, son pocas las referencias que muestran resultados de toxicidad con algas. En la base de datos bibliográficas creada por Rammamorthy y Baddaloo (1995) sólo se han encontrado dos citas con microalgas. Para *Microcystis aeruginosa* se ha detectado efectos umbrales tras una exposición crónica a una concentración de 4,60 mg/L de fenol. Para *Scenedesmus quadricauda* este nivel umbral se detecta en 7,50 mg/L de fenol. En esta base bibliográfica no se indica cuál es el periodo de exposición de estos ensayos. Comparando estos resultados con los IC₅ obtenidos y considerando que los resultados bibliográficos se refieren a efectos umbrales, los resultados obtenidos en el presente trabajo son comparables con los aportados por la bibliografía.

Ensayo de toxicidad del FENOL



N.G.: *N. gaditana*; I.G.: *I. galbana*; D.S.: *D. salina*; C.G.: *C. gracillis*; T.C.: *T. chuii*; M.M.: Microalgas Marinas (valores correspondiente a la media geométrica de los valores obtenidos para las cinco algas de ensayo)

Figura C III.30. Resultados de IC₅, IC₅₀ e IC₉₅ del ensayo de toxicidad del FENOL con 5 microalgas marinas para periodos de exposición de 72 y 96 horas

| | <u>IC5</u> | <u>IC50</u> | <u>IC95</u> | |
|------|----------------|--------------|--------------|--------------|
| 72 h | + sensibilidad | T. chuii | N. gaditana | D. salina |
| | ↑ | D. salina | D. salina | I. galbana |
| | ↓ | N. gaditana | I. galbana | T. chuii |
| | - sensibilidad | C. gracillis | T. chuii | C. gracillis |
| | | I. galbana | C. gracillis | N. gaditana |
| 96 h | + sensibilidad | T. chuii | N. gaditana | I. galbana |
| | ↑ | N. gaditana | D. salina | T. chuii |
| | ↓ | D. salina | I. galbana | C. gracillis |
| | - sensibilidad | C. gracillis | C. gracillis | D. salina |
| | | I. galbana | T. chuii | N. gaditana |

Figura C III.31. Sensibilidad de las especies de microalgas frente a fenol

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Los resultados obtenidos para las cinco microalgas son los siguientes:

| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracillis</i> | <i>T. chuii</i> |
|----------------------------|--|-------------------|--|--|--|
| Concentración alguistática | 500 mg/L | 350 mg/L | 500 mg/L | 500 mg/L | 500 mg/L |
| Concentración alguicida | No se ha determinado experimentalmente | 400 mg/L | No se ha determinado experimentalmente | No se ha determinado experimentalmente | No se ha determinado experimentalmente |

Para las algas *N. gaditana*, *D. salina*, *C. gracillis* y *T. chuii* se produjo un aumento de la concentración de biomasa de todos los cultivos, por tanto, se define la concentración alguistática como la mayor concentración ensayada para cada alga.

Hay que destacar la gran resistencia de las microalgas marinas frente a este compuesto de ensayo.

CONSIDERACIONES ADICIONALES SOBRE LOS VALORES NOEC, IC_P Y ALGUICIDAS

Para el nivel de efecto umbral existen algunos resultados los cuales hay que interpretarlos con precaución. Estos son los siguientes:

- ⊗ Valores de IC₅ de *N. gaditana* a las 72 h.
- ⊗ Valores de IC₅ de *D. salina* a las 72 y 96 h.
- ⊗ Valores de IC₅ de *C. gracillis* a las 96 h.

Para el nivel de efecto alguicida no hay que realizar ninguna consideración en este apartado.

4.1.3.2. ENSAYOS CON CRUSTÁCEOS. ARTEMIA

En este apartado se muestran los resultados de toxicidad obtenidos para *Artemia* expuesta a diversas concentraciones de fenol.

A partir del ensayo preliminar se determinaron las siguientes concentraciones de ensayo.

| <u>Especie</u> | <u>Concentración de FENOL (mg/L)</u> | | | | | | | | | | |
|-----------------------|--------------------------------------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Artemia salina</i> | 0,0 | 10,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 300,0 | 350,0 | 400,0 |

La siguiente gráfica muestra una representación de los supervivientes obtenidos en cada periodo de ensayo.

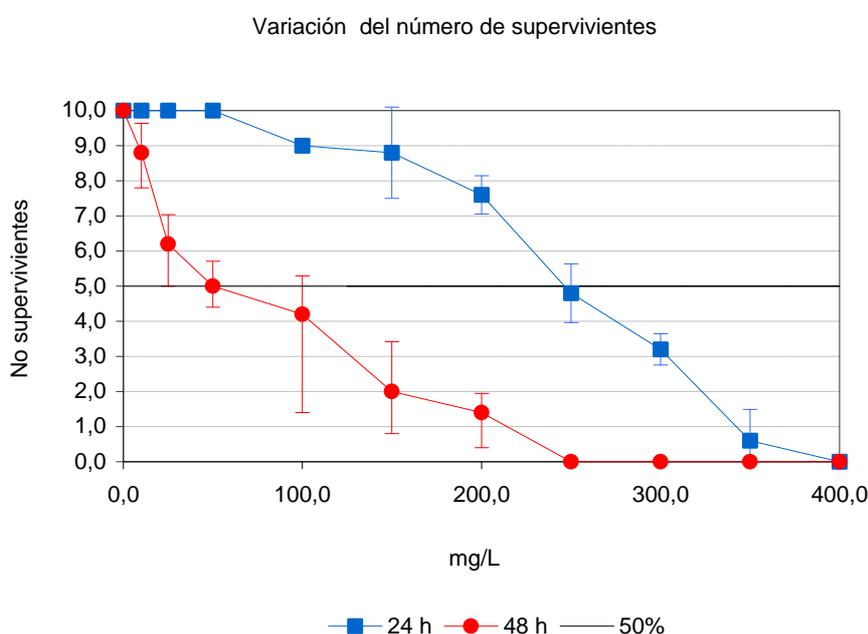


Figura C III.32. variación del número de supervivientes del ensayo de toxicidad del FENOL y *Artemia*

DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES

Como se puede observar en el gráfico, las primeras concentraciones de tóxico y el control a las 24 horas, y el control y las concentraciones más altas a las 48 horas presentan idénticos resultados en todos sus replicados, es decir la varianza para estas concentraciones es cero. Así pues y siguiendo las mismas pautas y consideraciones que se realizaron con los anteriores compuestos, mediante observación visual se determinan las siguientes concentraciones de efectos umbrales.

Para el ensayo de toxicidad aguda de *Artemia* y el fenol se establece la concentración de efectos mínimos observados en 100,0 mg/L a las 24 horas y de 10 mg/L a las 48 horas de exposición. La concentración de no-efecto se fija en 50 mg/L a las 24 horas, y no se establece para 48 horas.

DETERMINACIÓN DE LOS EC(P)

Método de interpolación gráfica

Mediante el método de interpolación gráfica, se han determinado los valores de LC₅₀ para cada periodo de exposición. Los resultados fueron los siguientes:

| FENOL (mg/L) | 24 h | 48 h |
|------------------|-------|------|
| LC ₅₀ | 246,4 | 63,8 |

Método Probit

La siguiente tabla muestra los valores medios para diversos LC(p) obtenidos mediante el método Probit.

Tabla CIII.32. Resultados de diferentes LC(p) obtenidos mediante el método Probit

| | 24 h | 48 h |
|-------------|---------|---------|
| LC/EC 1,00 | 96,741 | 3,385 |
| LC/EC 5,00 | 128,078 | 7,236 |
| LC/EC 10,00 | 148,747 | 10,850 |
| LC/EC 15,00 | 164,551 | 14,261 |
| LC/EC 50,00 | 252,146 | 45,290 |
| LC/EC 85,00 | 386,370 | 143,825 |
| LC/EC 90,00 | 427,421 | 189,044 |
| LC/EC 95,00 | 496,398 | 283,451 |
| LC/EC 99,00 | 657,193 | 605,924 |

χ^2 calculado (24 h)=87,553; χ^2 calculado (48 h)= 23,152; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados hay que interpretarlos con precaución (Notación del programa Probit)

La siguiente gráfica representa estos valores y sus límites de confianza.

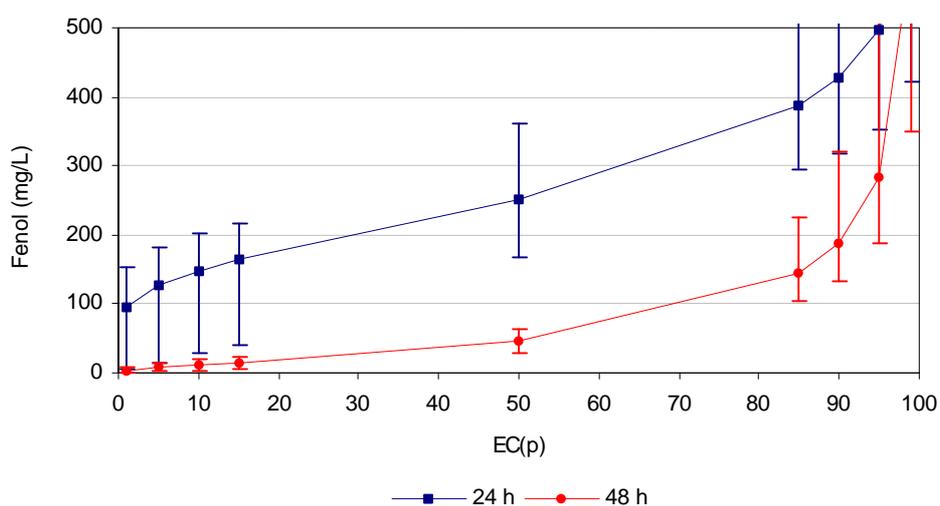


Figura C III.33. Valores de EC(p) calculados mediante el método Probit

De los resultados representados en la gráfica, hay que significar los altos intervalos de confianza obtenidos para cada concentración. Esto se debe a una gran variabilidad obtenida en el número de supervivientes de

los replicados de cada concentración. A las 48 horas, las respuestas obtenidas son más homogéneas y por tanto disminuyen los intervalos de confianza obtenidos por el programa.

Las LC_{50} obtenidas mediante la interpolación gráfica son 246,4 mg/L a las 24 h y 63,8 mg/L a las 48 horas de exposición. Las LC_{50} obtenidas mediante el método Probit son 252,2 mg/L a las 24 horas y 45,3 mg/L a las 48 horas de exposición.

Respecto a referencias ecotoxicológicas de este compuesto con organismos acuáticos, en el Anexo IV se resumen gran número de resultados. Sin duda, la referencia más significativa es una encontrada en la base de datos de Rammamorthy (1995) en la cual se establecen valores de toxicidad para *Artemia*. Para este organismo, se han documentado niveles umbrales para concentraciones de fenol de 56 mg/L para un periodo de exposición de 25 a 50 horas. Visualmente se determinaron las concentraciones umbrales entre 10-100 mg/L para los periodos de 24-48 horas. Como se puede apreciar, los resultados son completamente comparables con los obtenidos en la bibliografía.

Respecto a referencias con otros organismos, en el Anexo IV se muestran resultados de LC_{50} y efectos umbrales comparables con los obtenidos en el presente trabajo.

4.1.3.3. ENSAYOS CON BACTERIAS MARINAS. *VIBRIO FISCHERI*

Las concentraciones de ensayo utilizadas para la realización de esta prueba fueron las siguientes:

| <u>Especie</u> | <u>Concentración de FENOL (mg/L)</u> | | | | | | | | |
|------------------------|--------------------------------------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Vibrio fischeri</i> | 0,0 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 125,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 500,0 |

Para esta prueba, el control de calidad del ensayo mostró una inhibición de la luminiscencia al cabo de los 30 minutos de exposición del 49,0% respecto al control de NaCl al 2%.

La siguiente gráfica muestra la representación gráfica de los diversos porcentajes de inhibición obtenidos para cada concentración.

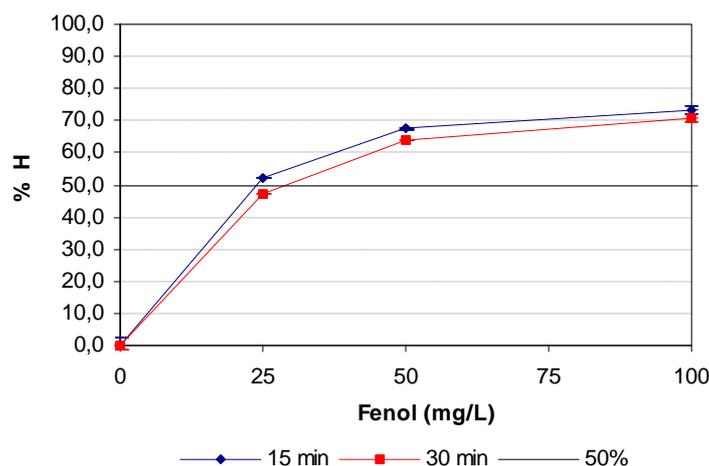


Figura C III.34. Variación de la inhibición del crecimiento con la concentración en el ensayo de toxicidad del FENOL y *Vibrio fischeri*

Para calcular el valor de las $EC(p)$ se linealizó la curva de inhibición de la bioluminiscencia convirtiendo los valores de porcentaje de inhibición en valores γ (EC_{50} para $\gamma=1$, EC_{25} para $\gamma=0,5$, y EC_5 para $\gamma=0,1$).

magnitud con el tiempo de exposición. La menor concentración determinada ha sido de 45,29 mg/L para el periodo de 48 h.

Resultados con *Vibrio fischeri*:

- ix) La gran similitud entre los valores obtenidos a los 15 y 30 minutos de ensayo permiten afirmar que el ensayo se ha realizado correctamente. La LC_{50} obtenida a los 30 minutos es de 27,71 mg/L Fenol.

Resultados comparativos:

- x) Comparando los resultados obtenidos en los diferentes niveles de efectos puede afirmarse que las algas muestran una mayor resistencia al fenol. De la batería de ensayos realizada, las bacterias marinas fueron los organismos más sensibles seguidos por la *Artemia*.
- xi) Las especies más resistentes fueron las algas *Chaetoceros gracilis* y *Tetraselmis chuii*.

4.1.4. TOXICIDAD DEL g-HEXACLOROCICLOHEXANO –LINDANO-

Antes de comentar los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad con lindano hay que hacer una referencia respecto a la metodología de preparación de las concentraciones de ensayo.

El lindano es muy poco soluble en agua. Para poder fabricar las concentraciones de ensayo fue preciso elaborar una solución madre de lindano utilizando como disolvente, una mezcla de agua de mar sintética y algún disolvente orgánico el cual garantizase la biodisponibilidad del compuesto. Para la fabricación de esta disolución madre, se realizaron pruebas con diversos disolventes (hexano, DMSO, acetona) siguiendo las recomendaciones de diversos autores para la disolución de este tipo de compuestos. Para fabricar un patrón de lindano de 1 g/L, los mejores resultados para realizar ensayos de toxicidad con microalgas ha sido la mezcla de Acetona-MilliQ® al 25% (v/v) (acetona de grado HPLC). A partir de esta madre, se construyeron patrones intermedios utilizando como disolvente agua de mar sintética, y finalmente se construyeron las disoluciones de ensayo. El patrón mayor de ensayo fue de 50 mg/L el cual presenta un contenido de acetona de 1,25%. A los patrones de concentraciones inferiores, se ajustó el porcentaje de acetona hasta un valor final de 1,25% y se incluyó en cada ensayo un control de agua de mar con un 1,25% de acetona.

En los ensayos de microalgas, no se ha observado una disminución del crecimiento significativa en los controles de acetona respecto a los controles de ensayo, por lo que para el análisis de resultados no se ha considerado el efecto tóxico de la acetona sobre la población de algas.

En el ensayo de *Artemia*, se observó una cierta mortalidad en los controles de acetona pero no fue significativamente superior a las obtenidas en las concentraciones más bajas ensayadas, por lo que tampoco se consideró el efecto tóxico de la acetona sobre la *Artemia*.

En los apartados siguientes, se resumen y comentan los resultados más relevantes obtenidos en los ensayos de toxicidad con lindano. En el Anexo V del presente documento, se encuentran detallados las condiciones de ensayo, mediciones de biomasa, cálculos realizados, así como otro tipo de información complementaria (propiedades físicas y químicas del compuesto y referencias ecotoxicológicas obtenidas por diversos autores).

4.1.4.1. ENSAYOS CON MICROALGAS MARINAS

Las concentraciones de ensayo seleccionadas a partir de un ensayo preliminar fueron las siguientes:

| <u>Especies</u> | <u>Concentración de lindano (mg/L)</u> | | | | | | | | | | | |
|--------------------|--|-------|------|------|------|-----|-----|-----|------|------|------|--|
| Microalgas marinas | 0,0 | 0,010 | 0,10 | 0,25 | 0,50 | 1,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 25,0 | 50,0 | |

En la figura C III.35. se muestra la evolución temporal de la concentración de biomasa normalizada de los ensayos de toxicidad del lindano y las microalgas marinas.

Para las cinco algas es posible distinguir tres grupos de curvas de crecimiento. El primer grupo estaría formado por aquellas curvas que presentan un crecimiento similar al control. Estas se corresponden con concentraciones de exposición de lindano de 0,01 a 5 mg/L. El segundo grupo estaría formado por las curvas de crecimiento correspondientes a las concentraciones de 25 y 50 mg/L de lindano las cuales muestran una alta inhibición en el crecimiento respecto a la población control. Para las algas *I. galbana*, *C. gracilis* y *T. chuii* se observa una muerte parcial de la población de microalgas mostrándose como valores negativos de concentración de biomasa normalizada.

En una situación intermedia a los dos grupos descritos anteriormente, se localiza la curva de crecimiento correspondiente a la concentración de 10 mg/L para todas las algas de ensayo excepto para el ensayo con *T. chuii* en el que esta zona intermedia está definida por las concentraciones de 2,5 a 10 mg/L de lindano.

En la figura C III.36. se muestra la curva dosis-respuesta para cada periodo de exposición. Con objeto de visualizar mejor los resultados y puesto que las concentraciones de ensayo están seleccionadas en un amplio rango de concentraciones (0,01 a 50 mg/L), el eje-x se ha construido en escala logarítmica.

Observando las curvas se puede apreciar como para este compuesto, las microalgas muestran dos tipos de comportamiento.

Por una parte, las algas *N. gaditana*, *D. salina*, *C. gracilis* y *T. chuii* presentan curvas de forma sigmoideal. En los extremos superiores se localizan los valores de biomasa normalizada correspondiente a las concentraciones de crecimiento similar al control (concentraciones de 0,01 a 5 mg/L). En los extremos inferiores se localizan los valores de biomasa normalizada correspondientes a las concentraciones que ejercen una fuerte inhibición (concentraciones de 25 y 50 mg/L). En el tramo intermedio de pendiente pronunciada se localiza la concentración de 10 mg/L.

Las curvas de *I. galbana* muestran un comportamiento similar al resto de algas ensayadas excepto en su extremo superior. Para este alga, se observan como las poblaciones expuestas a lindano entre 0,25 a 5 mg/L presentan un sobrecrecimiento respecto a la población control. A partir de 5 mg/L, se obtiene la forma habitual de la curva de variación de la biomasa normalizada respecto a la concentración de tóxico.

Este comportamiento no se observó en el ensayo preliminar por lo que sería preciso realizar más estudios al objeto de comprobar este efecto.

Del análisis de las gráficas C III.35. y C III.36. se puede decir que si bien no existe una amplia gama de respuestas de inhibiciones parciales del crecimiento, los resultados obtenidos permiten obtener las diferentes expresiones de toxicidad, efectos umbrales y diferentes ICp.

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo

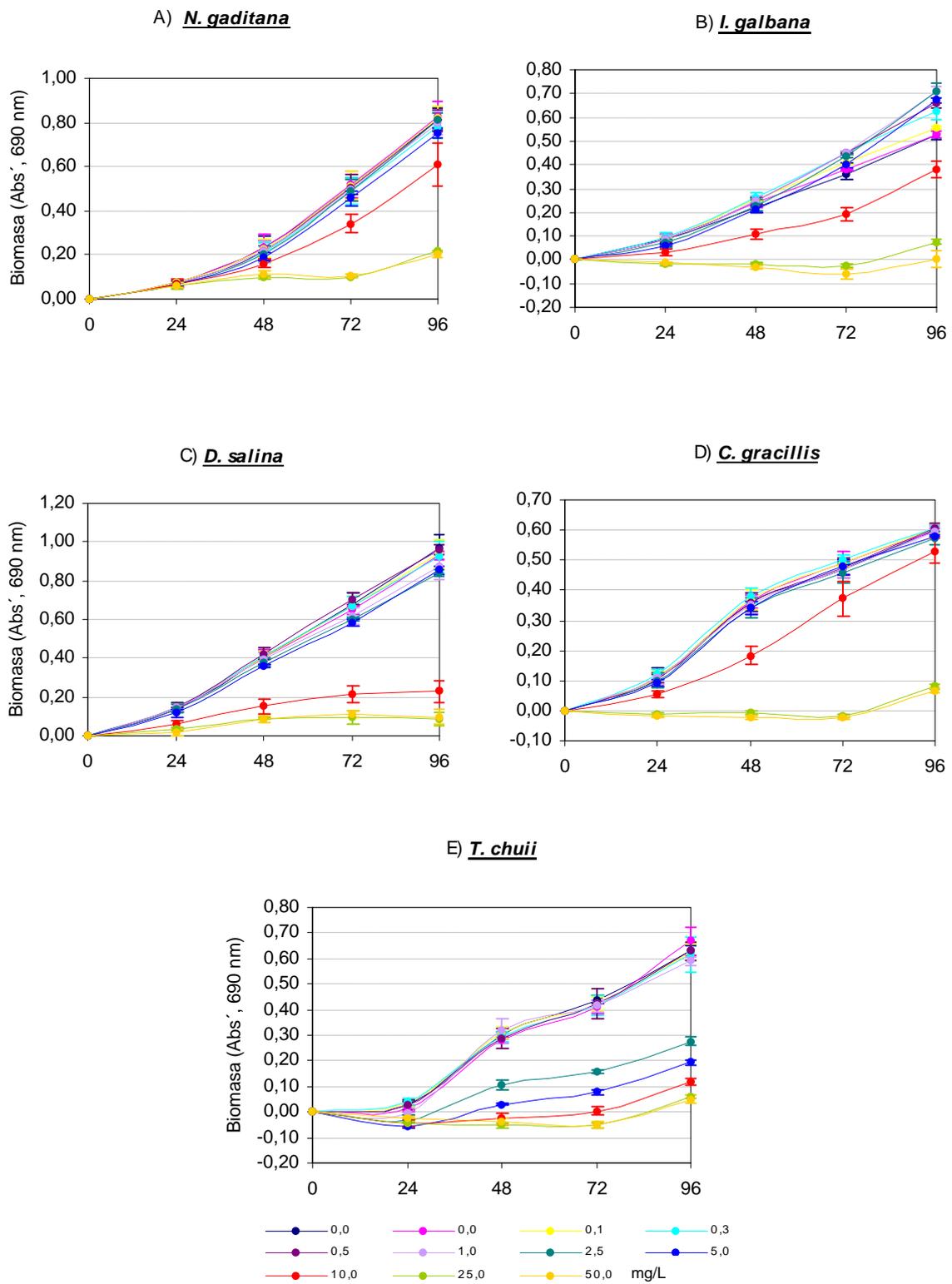


Figura C III.35. Evolución de la concentración de biomasa normalizada en el ensayo de toxicidad del LINDANO y microalgas marinas

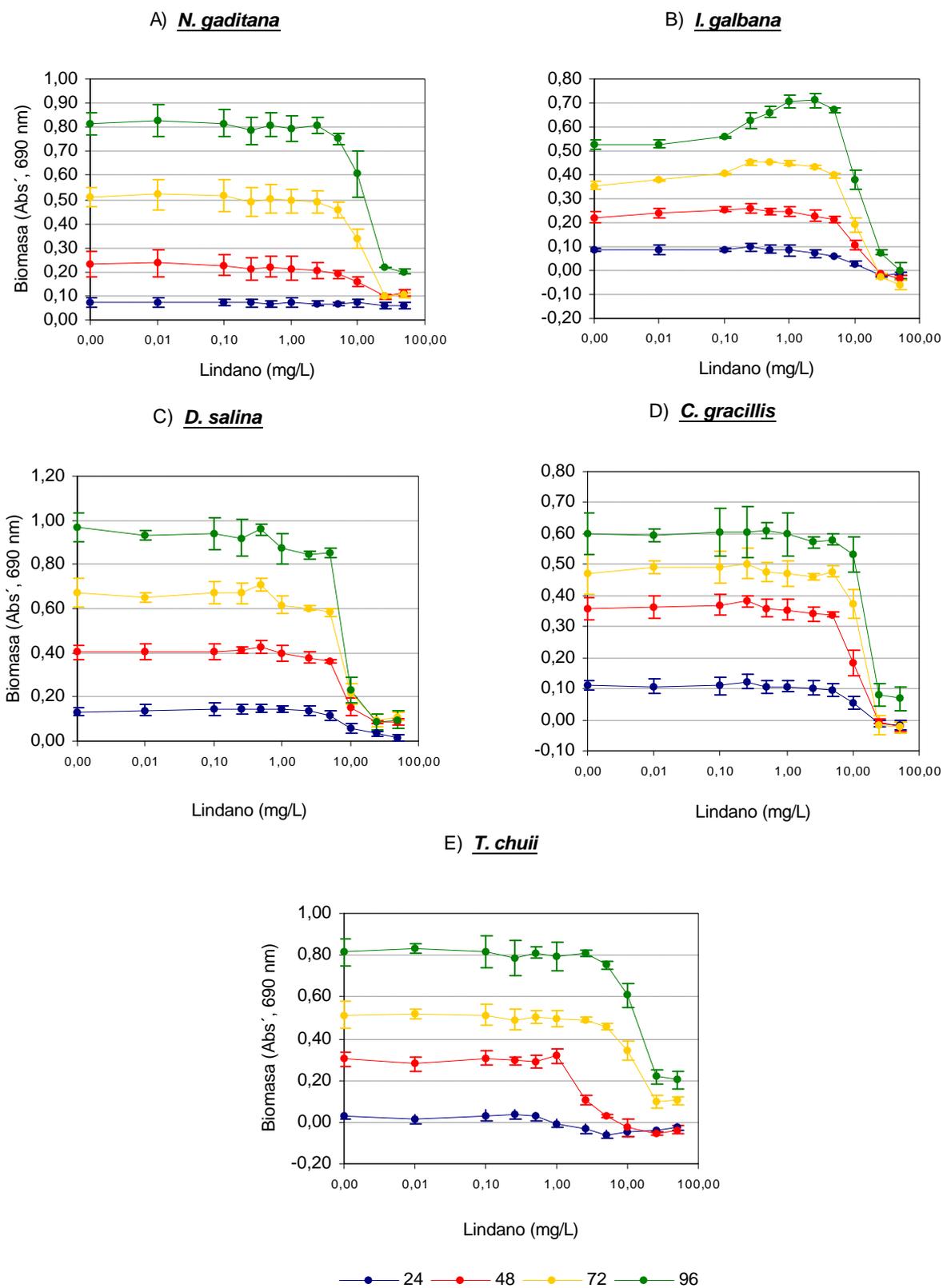


Figura C III.36. Variación de la concentración de biomasa normalizada con la concentración de LINDANO

OBTENCIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES

Se ensayó la normalidad de la distribución de resultados de crecimiento mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza mediante el test de Barlett. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla C III.34. W calculados del ensayo de LINDANO y microalgas marinas. Test de Shapiro Wilk

| Periodo de exposición | Test de Shapiro Wilk. W calculados | | | | | W crítico para N=33 y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 24 h | 0,942 | 0,959 | 0,921 | 0,971 | 0,962 | 0,931 |
| 48 h | 0,952 | 0,954 | 0,963 | 0,962 | 0,962 | |
| 72 h | 0,934 | 0,967 | 0,982 | 0,986 | 0,966 | |
| 96 h | 0,947 | 0,961 | 0,974 | 0,984 | 0,969 | |
| | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | |

Como puede observarse, en todos los ensayos y en todos los periodos de exposición se cumplió la condición de normalidad de la distribución de resultados.

Tabla C III.35. B calculados del ensayo de LINDANO y microalgas marinas. Test de Barlett

| Periodo de exposición | Test de Barlett. B calculados | | | | | B crítico para 10 grados de libertad y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|--|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 24 h | 2,44 | 12,41 | 2,78 | 10,90 | 10,72 | 18,31 |
| 48 h | 8,98 | 7,19 | 7,85 | 9,63 | 12,45 | |
| 72 h | 15,08 | 15,56 | 9,03 | 14,18 | 14,47 | |
| 96 h | 17,10 | 8,63 | 9,28 | 12,55 | 14,71 | |
| | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | |

Los resultados indican homogeneidad de la varianza en todos los casos.

Los resultados obtenidos de la aplicación del test de Dunnett fueron los siguientes:

Tabla C III.36. t calculados del ensayo de LINDANO y microalgas marinas (t=72 h). Método de Dunnett

| mg/L LINDANO | Test de Dunnett. Valores de t-calculados | | | | | T crítica para 22 grados de libertad y 10 concentraciones |
|--------------|--|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|---|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 0,010 | -0,23 | -1,83 | 0,80 | -0,85 | 1,18 | 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 0,10 | -0,07 | -4,40 (**) | 0,13 | -0,89 | 0,76 | |
| 0,25 | 0,54 | -8,42 (**) | 0,19 | -1,43 | 0,91 | |
| 0,50 | 0,20 | -8,59 (**) | -0,98 | -0,22 | 0,60 | |
| 1,0 | 0,42 | -8,27 (**) | 1,92 | -0,07 | 1,11 | |
| 2,5 | 0,56 | -7,09 (**) | 2,37 | 0,40 | 12,68 (*) | |
| 5,0 | 1,43 | -3,75 (**) | 2,98 (*) | -0,32 | 16,29 | |
| 10,0 | 4,45 (*) | 14,65 (*) | 14,82 | 4,05 (*) | 19,55 | |
| 25,0 | 10,81 | 33,81 | 18,68 | 20,26 | 22,12 | |
| 50,0 | 10,66 | 36,76 | 18,21 | 20,64 | 22,03 | |

Tabla C III.37. t calculados del ensayo de LINDANO y microalgas marinas (t=96 h). Método de Dunnett

| mg/L LINDANO | Test de Dunnett. Valores de t -calculados | | | | | T crítica para 22 grados de libertad y 10 concentraciones |
|-----------------|---|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|---|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 0,010 | -0,36 | -0,02 | 0,93 | 0,32 | -1,48 | |
| 0,10 | -0,03 | -1,49 | 0,75 | -0,36 | 0,20 | |
| 0,25 | 0,68 | -4,94 (**) | 1,18 | -0,29 | 0,56 | 2,64 |
| 0,50 | 0,09 | -6,81 (**) | 0,26 | -0,59 | 0,00 | |
| 1,0 | 0,44 | -9,05 (**) | 2,36 | 0,16 | 1,53 | |
| 2,5 | 0,15 | -9,24 (**) | 3,07 (*) | 1,81 | 13,49 (*) | |
| 5,0 | 1,48 | -7,20 (**) | 2,79 | 1,24 | 16,68 | |
| 10,0 | 4,86 (*) | 7,41 (*) | 17,70 | 4,60 (*) | 19,62 | |
| 25,0 | 14,04 | 22,74 | 21,08 | 35,14 | 21,77 | |
| 50,0 | 14,44 | 26,41 | 20,85 | 36,00 | 22,20 | |

* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola).

Los resultados señalados con un asterisco representan el umbral de toxicidad, esto es la LOEC. Para este ensayo, los resultados señalados con doble asterisco indican un sobrecrecimiento estadísticamente significativo respecto a los controles de ensayo.

La siguiente tabla muestra un resumen de los resultados umbrales obtenidos:

Tabla C III.38. Valores NOEC y LOEC obtenidos en el ensayos del LINDANO y las microalgas marinas

| 72 h | Microalgas Marinas | | | | |
|------|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> |
| NOEC | 5,0 | --- | 2,5 | 5,0 | 1,0 |
| LOEC | 10,0 | 10,0 | 5,0 | 10,0 | 2,5 |
| 96 h | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> |
| NOEC | 5,0 | --- | 1,0 | 5,0 | 1,0 |
| LOEC | 10,0 | 10,0 | 2,5 | 10,0 | 2,5 |

Para el alga *I. galbana* no ha sido posible determinar la concentración NOEC aunque debe encontrarse entre 5 y 10. El diseño experimental en relación con la selección de concentraciones de ensayo no ha permitido determinar el límite real ente las concentraciones de tóxico que producen un sobrecrecimiento y las que producen una inhibición.

Los resultados mostrados en la tabla, indican que respecto a los efectos umbrales, el alga más sensible a las 72 y 96 horas de exposición es *T. chuii* determinándose mediante el test de Dunnett una LOEC de 2,5 mg/L y por tanto una NOEC de 1 mg/L. *D. salina* también muestra estos efectos umbrales a las 96 horas.

Para el resto de microalgas y en ambos periodos de exposición se determinan los efectos umbrales siguientes: NOEC=5 mg/L y LOEC=10 mg/L.

DETERMINACIÓN DE LOS IC_p

Los resultados de los valores medios de los IC_p calculados para cada una de las algas se muestra en la tabla siguiente.

Tabla C III.39. IC_p calculados en el ensayo de LINDANO y microalgas marinas

| t (h) | Expresión de toxicidad | Valores de IC _p | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|------------------------|----------------------------|-------|-------|-------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
| | | <i>N. gaditana</i> | | | <i>I. galbana</i> | | | <i>D. salina</i> | | | <i>C. gracilis</i> | | | <i>T. chuii</i> | | |
| | | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES |
| 72 | IC ₅ | -2,76 | 1,20 | 6,57 | 3,38 | 4,91 | 5,52 | -0,86 | 0,68 | 2,48 | -4,81 | 3,54 | 7,01 | -0,82 | 0,51 | 1,45 |
| | IC ₂₅ | 4,38 | 7,74 | 10,68 | 6,43 | 7,05 | 7,78 | 4,75 | 5,93 | 6,62 | 5,95 | 10,21 | 14,00 | 1,17 | 1,47 | 1,65 |
| | IC ₅₀ | 10,06 | 14,85 | 17,67 | 8,29 | 9,61 | 11,95 | 7,19 | 8,26 | 9,07 | 11,33 | 15,10 | 17,55 | 1,99 | 2,12 | 2,22 |
| | IC ₇₅ | 21,66 | 23,04 | 23,99 | 13,35 | 16,72 | 19,06 | 3,18 | 15,60 | 21,02 | 18,08 | 20,04 | 21,35 | 3,53 | 3,95 | 4,34 |
| | IC ₉₅ | (*) | | | 22,68 | 23,36 | 23,81 | (*) | | | 23,63 | 24,01 | 24,26 | 8,09 | 8,86 | 11,14 |
| 96 | IC ₅ | -3,82 | 2,38 | 6,48 | 5,46 | 5,64 | 5,87 | -0,68 | 0,50 | 2,49 | -2,57 | 4,73 | 8,89 | -0,63 | 0,41 | 1,35 |
| | IC ₂₅ | 5,37 | 9,70 | 16,01 | 7,30 | 8,22 | 9,34 | 5,25 | 5,94 | 6,61 | 9,89 | 12,59 | 14,43 | 1,28 | 1,49 | 1,69 |
| | IC ₅₀ | 13,03 | 17,35 | 20,51 | 9,98 | 13,30 | 15,88 | 7,23 | 7,91 | 8,60 | 16,08 | 17,62 | 18,76 | 2,09 | 2,27 | 2,47 |
| | IC ₇₅ | (**) | 38,49 | (**) | 19,76 | 21,00 | 22,10 | 9,07 | 10,34 | 16,80 | 21,96 | 22,65 | 23,21 | 5,61 | 7,02 | 8,49 |
| | IC ₉₅ | (**) | | | (**) | 41,08 | (**) | | | | | | | | | |

Método *bootstrap*. Valores medios; ICEI: Intervalo de confianza expandido inferior; ICEI: Intervalo de confianza expandido superior

(*) No es posible calcular la interpolación lineal

(**) No es posible calcular los intervalos de confianza

En las gráficas expuestas en la Figura C III.37., se representan los valores de IC₅, IC₅₀ e IC₉₅ a las 72 y 96 h de exposición obtenidos en los ensayos de lindano y las cinco especies de microalgas de ensayo. La última columna de cada gráfico representa la media geométrica de los valores de IC_p obtenidos para cada microalga. En la Figura C III.31. se representa una clasificación de las algas en función de la sensibilidad a este tóxico.

Los resultados obtenidos a las 72 y 96 horas, permiten identificar dos tipos de comportamiento de las microalgas frente al tóxico. Para las algas *N. gaditana*, *I. galbana*, *C. gracilis* y *T. chuii* y se observa un aumento generalizados de las concentraciones IC_p a las 96 horas de exposición respecto a los obtenidos a las 72 horas, esto es, se muestra una adaptación al tóxico. Para el alga *D. salina*, estas concentraciones disminuyen a las 96 horas, esto es, a medida que transcurre el tiempo de exposición, el alga muestra una mayor sensibilidad al tóxico.

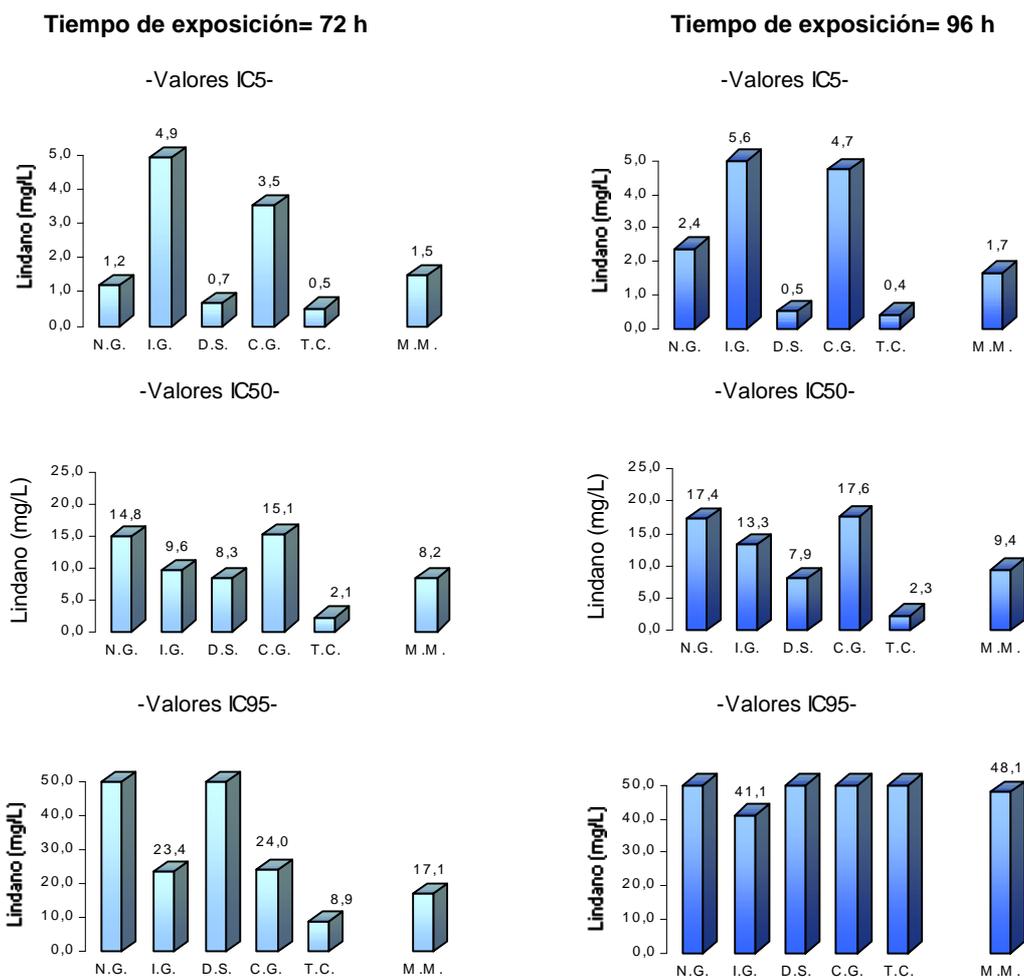
Observando la tabla de resultados se comprueba que la concentración IC₉₅ sólo se ha podido estimar para el alga *I. galbana* en el periodo de exposición de 96 h. La media geométrica queda definida por tanto, como el valor de IC₉₅ obtenido para este alga.

Otro aspecto a destacar de estos resultados es los estrechos intervalos de confianza obtenidos para cada IC_p lo cual es indicativo de la exactitud de las concentraciones calculadas.

Respecto a la clasificación de las algas en función de su sensibilidad o su resistencia al tóxico en los periodos de 72 y 96 horas se observa una gran repetitividad en el orden relativo de éstas. Así, para niveles de efecto pequeños (IC₅), las algas más sensibles por orden son *T. chuii*, *D. salina* y *N. gaditana*. La más resistente es *I. galbana* seguida de *C. gracilis*.

Para las IC₅₀ la clasificación cambia para las algas más resistentes. *T. chuii* y *D. salina* aparecen de nuevo como las más sensibles seguidas por *I. galbana*. Las más resistentes en función de esta respuesta son por orden *C. gracilis* y *N. gaditana*.

Ensayo de toxicidad del LINDANO



N.G.: *N. gaditana*; I.G.: *I. galbana*; D.S.: *D. salina*; C.G.: *C. gracilis*; T.C.: *T. chuii*; M.M.: Microalgas Marinas (valores correspondiente a la media geométrica de los valores obtenidos para las cinco algas de ensayo)

Figura C III.37. Resultados de IC₅, IC₅₀ e IC₉₅ del ensayo de toxicidad del LINDANO con 5 microalgas marinas para periodos de exposición de 72 y 96 horas

| | | <u>IC5</u> | <u>IC50</u> | <u>IC95</u> |
|------|----------------|-------------|-------------|-------------|
| 72 h | + sensibilidad | T. chuii | T. chuii | T. chuii |
| | ↑ | D. salina | D. salina | I. galbana |
| | | N. gaditana | I. galbana | C. gracilis |
| | ↓ | C. gracilis | N. gaditana | N. gaditana |
| | - sensibilidad | I. galbana | C. gracilis | D. salina |
| | | <u>IC5</u> | <u>IC50</u> | <u>IC95</u> |
| 96 h | + sensibilidad | T. chuii | T. chuii | I. galbana |
| | ↑ | D. salina | D. salina | |
| | | N. gaditana | I. galbana | |
| | ↓ | C. gracilis | N. gaditana | |
| | - sensibilidad | I. galbana | C. gracilis | |

Figura C III.38. Sensibilidad de las especies de microalgas frente a lindano

Anteriormente a la realización de este ensayo definitivo, se expusieron los resultados obtenidos del ensayo preliminar en el congreso internacional anual que celebra la SETAC (Society of Environmental Toxicology and Chemistry) (Garrido *et al.*, 2000). Para este ensayo preliminar se obtuvieron los siguientes resultados de LC₅₀ a las 72 horas de exposición mediante el método de interpolación gráfica:

| | Garrido <i>et al.</i> (2000) | Presente estudio |
|--------------------|---------------------------------|------------------------|
| <i>N. gaditana</i> | 11,47 | 14,8 |
| <i>I. galbana</i> | 2,03 | 9,6 |
| <i>D. salina</i> | 4,66 | 8,3 |
| <i>C. gracilis</i> | 5,34 | 15,1 |
| <i>T. chuii</i> | 1,92 | 2,1 |
| | Método de interpolación gráfica | Método IC _p |

Si bien los métodos de cálculo son diferentes, las LC₅₀ obtenidas en el presente trabajo son muy similares, con la ventaja de que mediante el método IC_p es posible calcular los intervalos de confianza.

Para el alga *N. gaditana* se ha obtenido unos límites de confianza expandidos inferior y superior de 10,06 y 17,67 mg/L de lindano respectivamente. Así pues, los resultados obtenidos en el ensayo preliminar y definitivo son idénticos.

Para el resto de algas, los estrechos intervalos de confianza obtenidos en este ensayo dejan ligeramente fuera los resultados obtenidos en el ensayo preliminar. Para algunas algas como *T. chuii*, esta diferencia es insignificante puesto que la LC₅₀ obtenida en el ensayo preliminar fue de 1,92 mg/L y el límite de confianza expandido inferior del ensayo definitivo ha sido de 1,99 mg/L.

Respecto a otros resultados bibliográficos se ha encontrado una cita que establece el umbral de efecto del alga *Mycrocystis aureginosa* en 0,30 mg/L tras una exposición crónica a lindano (Rammamorthy y Baddaloo, 1995).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Los resultados obtenidos para las cinco microalgas son los siguientes:

| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> |
|----------------------------|--|--|--|--|-----------------|
| Concentración alguistática | 50 mg/L | 50 mg/L | 50 mg/L | 50 mg/L | 25 mg/L |
| Concentración alguicida | No se ha determinado experimentalmente | 50 mg/L |

Para estas concentraciones de efecto, sólo para el alga *T. chuii* se determinó la concentración alguicida en 50 mg/L de lindano.

CONSIDERACIONES ADICIONALES SOBRE LOS VALORES NOEC, IC_p Y ALGUICIDAS

Para el nivel de efecto umbral existen algunos resultados los cuales hay que interpretarlos con precaución. Estos son los siguientes:

- ⊗ Valores de IC₅ de *N. gaditana* a las 72 y 96 h.
- ⊗ Valores de IC₅ de *D. salina* a las 72 y 96 h.
- ⊗ Valores de IC₅ de *C. gracilis* a las 72 y 96 h.
- ⊗ Valores de IC₅ de *T. chuii* a las 72 y 96 h.

Para el nivel de efecto aliguida no hay que realizar ninguna consideración en este apartado.

4.1.4.2. ENSAYOS CON CRUSTÁCEOS. ARTEMIA

En este apartado se muestran los resultados de toxicidad obtenidos para *Artemia* expuesta a diversas concentraciones de lindano.

Debido a la complejidad de la preparación de las disoluciones de ensayo, se utilizó las mismas concentraciones seleccionadas en el ensayo con algas. Así pues, éstas fueron las siguientes:

| <u>Especie</u> | <u>Concentración de LINDANO (mg/L)</u> | | | | | | | | | |
|----------------|--|------|------|------|------|-----|-----|-----|------|------|
| <i>Artemia</i> | 0,0 | 0,01 | 0,10 | 0,25 | 0,50 | 1,0 | 2,5 | 5,0 | 10,0 | 25,0 |

La siguiente gráfica muestra una representación de los porcentajes de supervivientes obtenidos en cada periodo de ensayo.

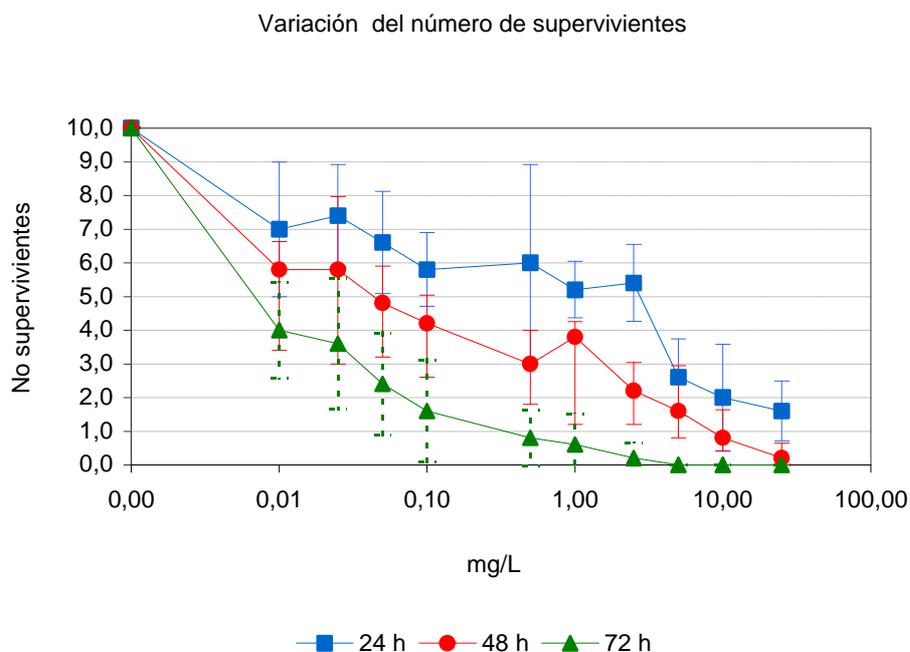


Figura C III.39. variación del número de supervivientes del ensayo de toxicidad del LINDANO y *Artemia*

DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES

Gráficamente, para el ensayo de toxicidad aguda de *Artemia* y el lindano se establece la concentración de efectos mínimos observados en 0,010 mg/L a las 24, 48 y 72 horas de exposición. Al ser ésta la menor concentración ensayada, no es posible determinar la concentración de no-efectos observados.

Para este ensayo sería conveniente realizar estudios acerca de la toxicidad del compuesto a concentraciones inferiores a 0,01 mg/L de lindano.

DETERMINACIÓN DE LOS EC(P)

Método de interpolación gráfica

Mediante el método de interpolación gráfica, se han determinado los valores de LC₅₀ para cada periodo de exposición. Los resultados fueron los siguientes:

| Lindano (mg/L) | 24 h | 48 h | 72 h |
|------------------|-------|-------|-------|
| LC ₅₀ | 2,857 | 0,033 | 0,008 |

Para este compuesto, la *Artemia* muestra una mayor sensibilidad al tóxico a medida que aumenta el tiempo de exposición. Hay que resaltar que para este compuestos, la magnitud de este aumento de sensibilidad es de 3 órdenes de magnitud.

Método Probit

Las siguiente tabla muestras los valores medios para diversos LC(p) obtenidos mediante el método Probit.

Tabla CIII.32. Resultados de diferentes LC(p) obtenidos mediante el método Probit

| | 24 h | 48 h | 72 h |
|-------------|-----------|----------|-------|
| LC/EC 1,00 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| LC/EC 5,00 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| LC/EC 10,00 | 0,001 | 0,000 | 0,000 |
| LC/EC 15,00 | 0,003 | 0,000 | 0,000 |
| LC/EC 50,00 | 0,500 | 0,044 | 0,006 |
| LC/EC 85,00 | 98,553 | 4,906 | 0,122 |
| LC/EC 90,00 | 343,981 | 14,975 | 0,252 |
| LC/EC 95,00 | 2192,128 | 78,251 | 0,732 |
| LC/EC 99,00 | 70706,625 | 1739,294 | 5,427 |

χ^2 calculado (24 h)=13,970; χ^2 calculado (48 h)= 8,941; χ^2 calculado (72 h)= 1,855; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados hay que interpretarlos con precaución (Notación del programa Probit)

La gráfica siguiente muestra estos valores medios con sus intervalos de confianza. Debido a las altas concentraciones estimadas por el programa para los mayores niveles de efecto, se ha construido la gráfica con el eje-y en escala logarítmica limitando el eje hasta la concentración de 1000 mg/L.

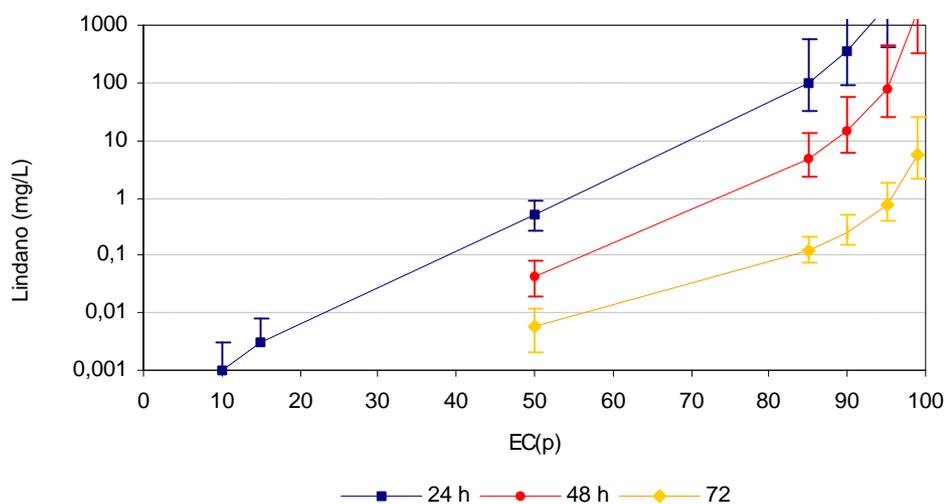


Figura C III.40. Valores de EC(p) calculados mediante el método Probit

De los resultados representados en la gráfica, hay que volver a significar las altas concentraciones obtenidas para respuestas superiores al 50% de efecto para los periodos de 24 y 48 horas.

La concentración mayor ensayada ha sido de 25 mg/L de lindano. En función de los resultados mostrados, las concentraciones más significativas para este ensayo son las diferentes LC₅₀ obtenidas, y las diferentes ICp obtenidas a las 72 horas de exposición.

Las LC₅₀ obtenidas mediante interpolación gráfica son 2,857, 0,033 y 0,008 para los periodos de 24, 48 y 72 h. Las LC₅₀ obtenidas mediante el método Probit son 0,500, 0,044 y 0,006 mg/L para los periodos de 24, 48 y 72 horas respectivamente.

Respecto a referencias ecotoxicológicas de este compuesto con organismos acuáticos, en el Anexo V se muestran un gran número de citas bibliográficas. Sin duda, las referencias más significativas son las que muestran resultados toxicológicos con *Artemia salina* (Rammamorthy, 1995) mostrando valores de LC₅₀ de 1,4-0,5 mg/L para el isómero α -hexaclorociclohexano. Si bien el compuesto de ensayo utilizado en el presente trabajo es el isómero γ , los niveles de concentración son comparables con los resultados obtenidos para el isómero α .

Respecto a referencias con otros organismos, los datos recogidos en el Anexo V muestran resultados de LC₅₀ y efectos umbrales en el rango de 0,00004 a 13 mg/L y por tanto en el mismo orden de magnitud que los obtenidos en el presente trabajo.

Finalmente, se concluye que los resultados de toxicidad con lindano y *Artemia* han obtenido resultados coherentes y en el rango de concentraciones encontradas en otras fuentes bibliográficas.

4.1.4.3. ENSAYOS CON BACTERIAS MARINAS. *VIBRIO FISCHERI*

Las concentraciones de ensayo utilizadas para la realización de esta prueba fueron las siguientes:

| Especie | Concentración de LINDANO (mg/L) | | | | | | | | | |
|------------------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|
| <i>Vibrio fischeri</i> | 0,000 | 0,195 | 0,391 | 0,781 | 1,563 | 3,125 | 6,25 | 12,5 | 25,0 | 50,0 |

Para esta prueba, el control de calidad del ensayo mostró una inhibición de la luminiscencia al cabo de los 30 minutos de exposición del 41,9 % respecto al control de NaCl al 2%.

La siguiente gráfica muestra la representación gráfica de los diversos porcentajes de inhibición obtenidos para cada concentración.

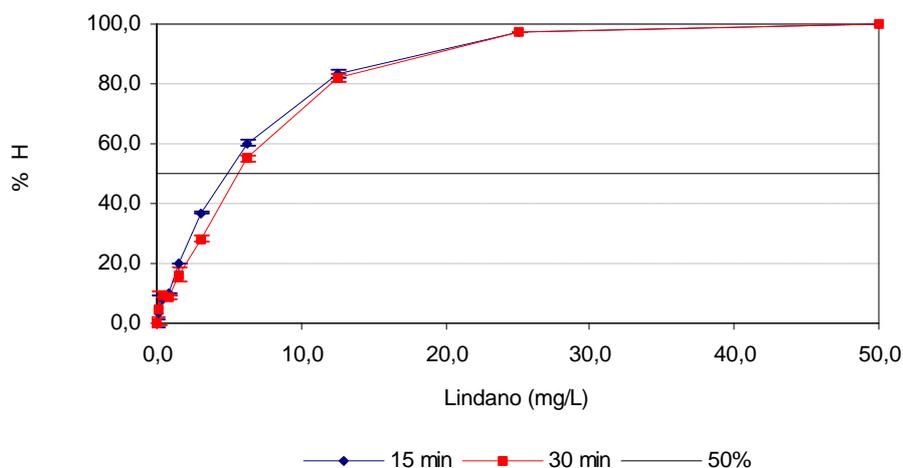


Figura C III.41. Variación de la inhibición del crecimiento con la concentración en el ensayo de toxicidad del LINDANO y *Vibrio fischeri*

Para calcular el valor de las EC(p) se linealizó la curva de inhibición de la bioluminiscencia convirtiendo los valores de porcentaje de inhibición en valores γ (EC₅₀ para $\gamma=1$, EC₂₅ para $\gamma=0,5$, y EC₅ para $\gamma=0,1$).

Los resultados de EC₅₀ obtenidos mediante el método de interpolación gráfica fueron los siguientes:

Tabla C III.40. EC(p) obtenidos mediante el método de interpolación gráfica en el ensayo de toxicidad del lindano y *Vibrio fischeri*

| | <i>t=15 min</i> | <i>t=30 min</i> |
|------------------|-----------------|-----------------|
| EC ₅ | 1,29 | 2,19 |
| EC ₂₅ | 3,42 | 6,95 |
| EC ₅₀ | 5,30 | 8,59 |

Para este compuesto, no se han documentado referencias bibliográficas que permitan comparar las concentraciones obtenidas por otros autores en el ensayo de inhibición de la luminiscencia. Comparando los resultados mostrados en la Tabla C III.40. se puede observar que los resultados obtenidos son comparables que un gran número de referencias bibliográficas.

4.1.4.4. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL ENSAYO DEL LINDANO

A partir de los resultados obtenidos con los tres taxones de ensayo se obtienen las siguientes conclusiones generales:

Resultados con microalgas:

- i) Los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad con cinco microalgas y lindano demuestran que el diseño experimental y las medidas de biomasa obtenidas en función de la turbidez de la muestra, permiten obtener un conjunto de resultados de toxicidad coherentes. Si bien, se propone ampliar el estudio realizado en el rango de 5 a 25 mg/L.
- ii) Los diferentes resultados obtenidos en cada nivel de efecto (umbral, inhibición parcial del crecimiento y niveles alucinados) permiten afirmar que la toxicidad del lindano depende de la

especie de ensayo. La similitud entre los valores obtenidos a las 72 y 96 horas indican que el tiempo de exposición es un factor que influye en los resultados, pero no en gran magnitud.

- iii) La menor NOEC obtenida es de 0,01 mg/L de lindano.
- iv) Los valores de IC₅₀ obtenidos para las diferentes especies varían entre 2,1 y 15,1 mg/L a las 72 horas, y entre 2,3 y 17,6 mg/L a las 96 horas de exposición.
- v) En función de la IC₅₀ se obtiene la siguiente escala de sensibilidad al tóxico:

| | | | | |
|--------------------------------|----------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| ← + sensible al lindano | + resistente al lindano → | | | |
| <i>T. chuii</i> | <i>D. salina</i> | <i>I. galbana</i> | <i>N. gaditana</i> | <i>C. gracilis</i> |

- vi) Respecto al nivel alguicida, sólo ha sido posible determinar este nivel para una de las especies (50 mg/L). Por tanto, es necesario realizar nuevas experiencias al objeto de determinar estas concentraciones.

Resultados con *Artemia*:

- vii) Los resultados obtenidos tanto en el control como en las concentraciones de ensayo permiten afirmar que el diseño experimental ha sido correcto obteniéndose resultados coherentes y dentro de los rangos bibliográficos.
- viii) La gran diferencia entre los resultados de LC_p obtenidos en los diferentes periodos de exposición permiten concluir que la toxicidad del lindano en *Artemia* varía en un orden de magnitud con el tiempo de exposición. A las 72 horas de exposición, se ha obtenido una LC₅₀ de 0,008 mg/L.

Resultados con *Vibrio fischeri*:

- ix) La gran similitud entre los valores obtenidos a los 15 y 30 minutos de ensayo permiten afirmar que el ensayo se ha realizado correctamente obteniéndose resultados coherentes y dentro de los rangos bibliográficos. La LC₅₀ obtenida a los 30 minutos es de 8,51 mg/L Lindano.

Resultados comparativos:

Comparando los resultados obtenidos en los diferentes niveles de efectos para los tres taxones, se obtiene que el crustáceo *Artemia* es el organismo que presenta una mayor toxicidad al lindano. Los resultados obtenidos en bacterias marinas son intermedios a los estimados para las algas. Las especies más resistentes fueron *Chaetoceros gracilis* y *Nannochloropsis gaditana*.

4.1.5. TOXICIDAD DEL COBRE (II)

Para la realización del ensayo con cobre, y en general para todos los ensayos con metales, se realizó una variación en el medio nutriente utilizado consistente en la supresión del compuesto AEDT-Na₂. En el caso del ensayo con cobre, también se eliminó el suplemento de este elemento como metal esencial con el objeto de no variar las concentraciones de ensayo.

En los apartados siguientes, se resumen y comentan los resultados más relevantes obtenidos en los ensayo de toxicidad con cobre. En el Anexo VI del presente documento, se encuentran detallados las condiciones de ensayo, mediciones de biomasa, cálculos realizados, así como otro tipo de información complementaria (propiedades físicas y químicas del compuesto y referencias ecotoxicológicas obtenidas por diversos autores).

4.1.5.1. ENSAYOS CON MICROALGAS MARINAS

A partir de los resultados obtenidos en un ensayo preliminar se seleccionaron las siguientes concentraciones de ensayo:

| <u>Especies</u> | <u>Concentración de cobre (mg/L)</u> | | | | | | | | | | |
|--------------------|--------------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|
| Microalgas marinas | 0,00 | 0,20 | 0,39 | 0,78 | 1,56 | 3,13 | 6,25 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 |

En la figura C III.41. se muestra la evolución temporal de la concentración de biomasa normalizada de los ensayos de toxicidad del cobre y las microalgas marinas.

Las curvas de crecimiento obtenidas en estos ensayos muestran la respuesta de las algas frente a diferentes concentraciones de cobre. Para las cinco algas es posible distinguir dos tipos de comportamientos. Por una parte, las microalgas *I. galbana*, *D. salina* y *T. chuii* presentan una amplia gama de respuestas como así reflejan las diferentes pendientes de las curvas de crecimiento. Por otro lado, *N. gaditana* y *C. gracilis* muestran dos tipos de curvas de crecimiento: curvas de crecimiento similar al control, y curvas de crecimiento que reflejan una muy alta inhibición en el crecimiento de la población. Ambas algas toleran bien el compuesto hasta la concentración de 0,8 mg/L de Cu (II). A partir de esta concentración, la presencia del tóxico afecta radicalmente a la población provocando la muerte de un porcentaje importante de éstas. Estas dos algas se muestran en principio como las más sensibles al cobre.

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo

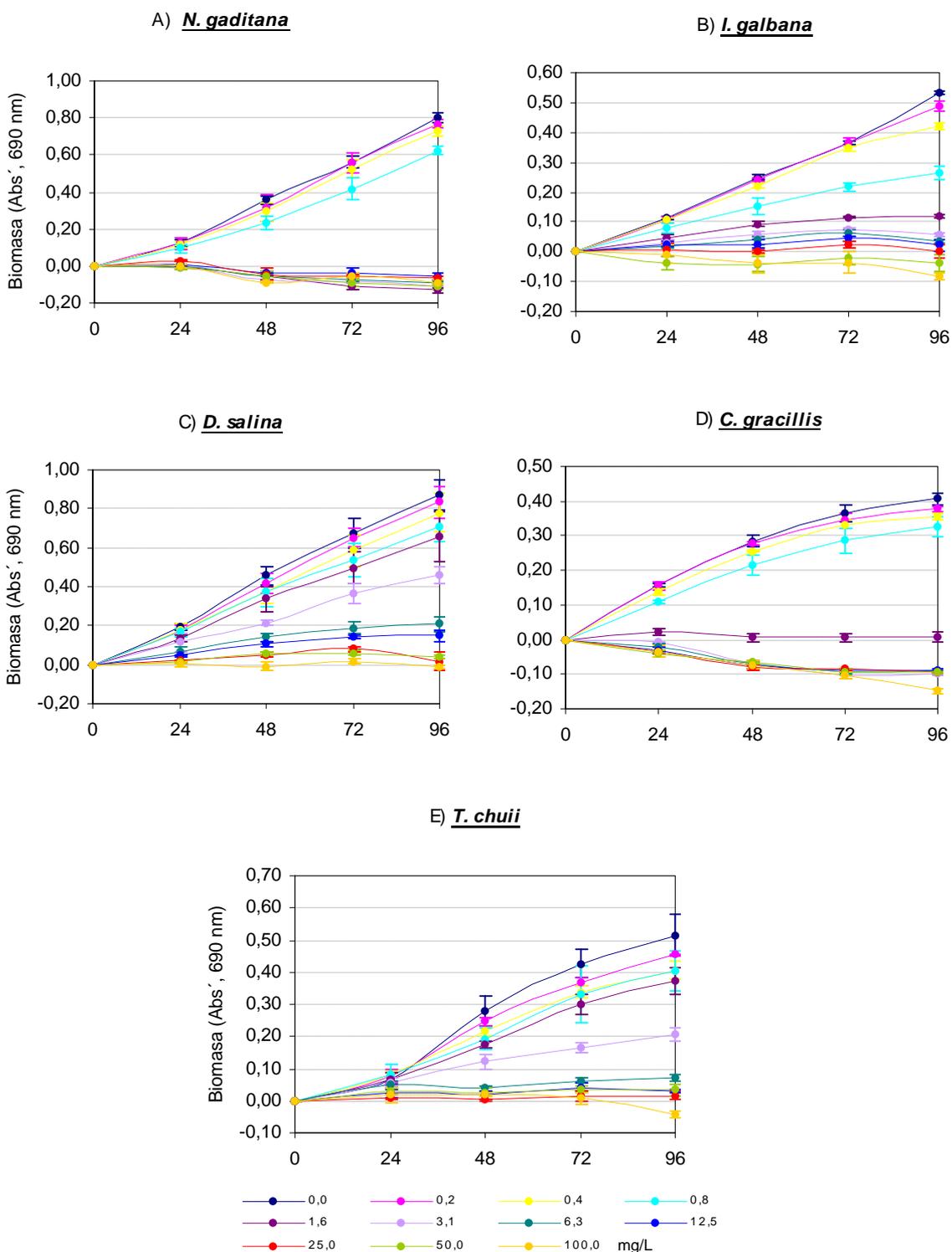


Figura C III.41. Evolución de la concentración de biomasa normalizada en el ensayo de toxicidad del COBRE y microalgas marinas

En la figura C III.42. se muestra la variación de la concentración de biomasa normalizada en el rango de concentraciones de ensayo para cada periodo de exposición. Con objeto de visualizar mejor los resultados y puesto que las concentraciones de ensayo están seleccionadas en un amplio rango de concentraciones (0,01 a 50 mg/L), el eje-x se ha construido en escala logarítmica.

Observando las curvas a las 72 y 96 horas de exposición se puede apreciar el comportamiento anteriormente descrito en las curvas de crecimiento. Para *N. gaditana* y *T. chuii* se observa un cambio radical en el comportamiento del alga a partir de la concentración de 1,56 mg/L. El resto de las algas muestran un comportamiento más gradual frente al tóxico.

En relación con la forma de las curvas, para los ensayos con *I. galbana*, *D. salina* y *C. gracilis* se observa la forma sigmoidal característica de este tipo de representación.

Para *N. gaditana* y *T. chuii*, si bien la curva toma forma sigmoidal, hay que tener en cuenta que en el tramo de pendiente acusada, el número de concentraciones es muy escaso e incluso nulo si se considera que la concentración de 1,56 mg/L pertenece al tramo inferior. Este hecho hay que tenerlo muy en cuenta a la hora de calcular e interpretar los diferentes ICp. Para ambas algas sería conveniente realizar el estudio de toxicidad en el rango de concentraciones de 0,78 a 3,13 mg/L de Cu (II).

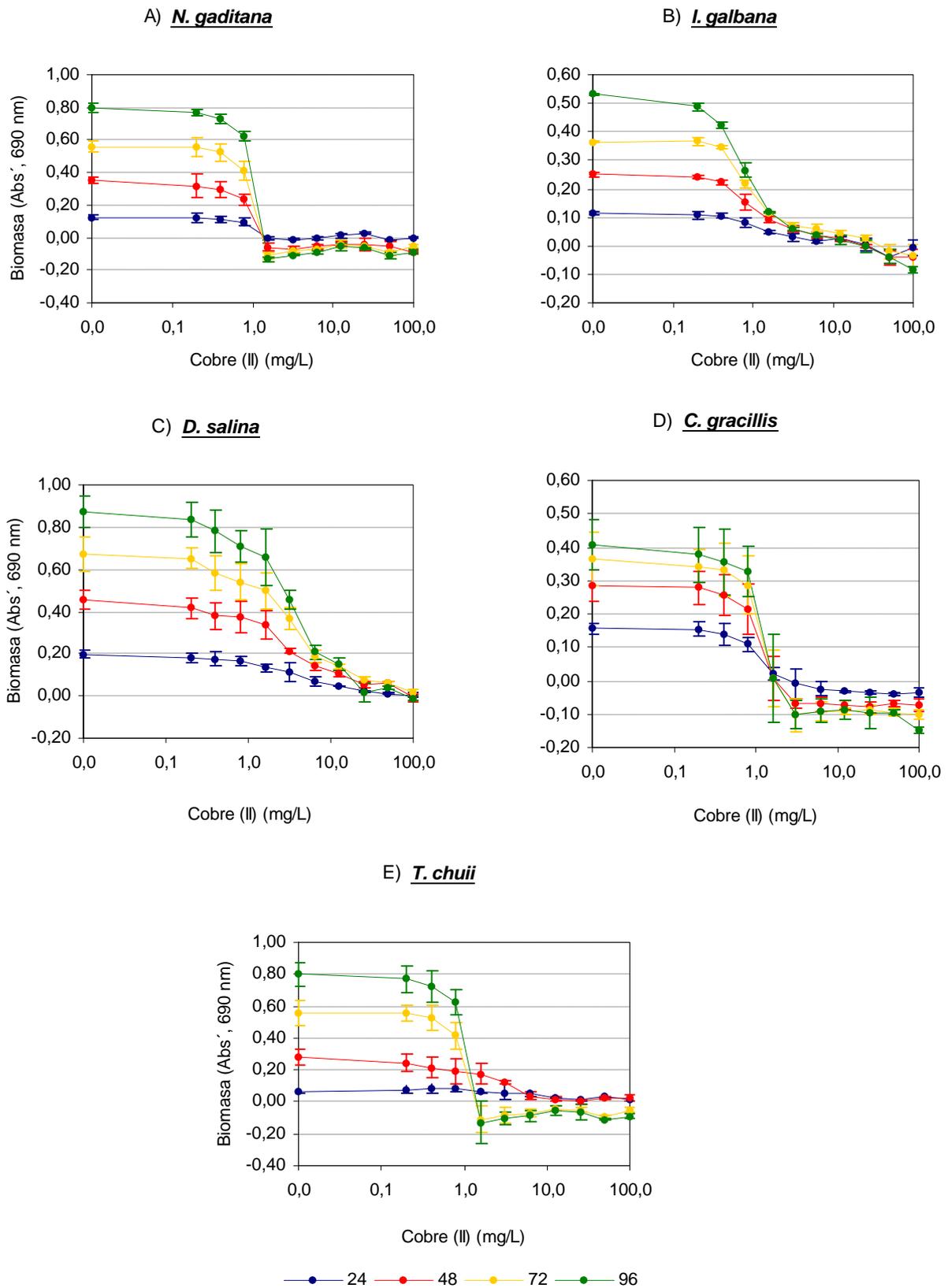


Figura C III.42. Variación de la concentración de biomasa normalizada con la concentración de COBRE

OBTENCIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES

Se ensayó la normalidad de la distribución de resultados de crecimiento mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza mediante el test de Barlett. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla C III.41. *W* calculados del ensayo de COBRE y microalgas marinas. Test de Shapiro Wilk

| Periodo de exposición | Test de Shapiro Wilk. <i>W</i> calculados | | | | | <i>W</i> crítico para N=33 y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 24 h | 0,972 | 0,979 | 0,969 | 0,983 | 0,961 | 0,931 |
| 48 h | 0,969 | 0,968 | 0,965 | 0,960 | 0,960 | |
| 72 h | 0,955 | 0,948 | 0,937 | 0,960 | 0,949 | |
| 96 h | 0,964 | 0,970 | 0,978 | 0,965 | 0,967 | |
| | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | |

Como puede observarse en la tabla, todos los ensayos y en todos los periodos de exposición se cumplió la condición de normalidad de la distribución de resultados.

Tabla C III.42. *B* calculados del ensayo de COBRE y microalgas marinas. Test de Barlett

| Periodo de exposición | Test de Barlett. <i>B</i> calculados | | | | | <i>B</i> crítico para 10 grados de libertad y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|--------------------------------------|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|---|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 24 h | 12,72 | 10,95 | 17,48 | 7,54 | 9,34 | 18,31 |
| 48 h | 13,58 | 13,24 | 15,62 | 13,47 | 17,25 | |
| 72 h | 15,13 | 16,97 | 17,48 | 17,21 | 14,16 | |
| 96 h | 10,68 | 12,67 | 17,46 | 17,21 | 18,20 | |
| | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | |

Los resultados indican en todos los casos homogeneidad de la varianza.

Los resultados obtenidos de la aplicación del test de Dunnett fueron los siguientes:

Tabla C III.43. *t* calculados del ensayo de COBRE y microalgas marinas (t=72 h). Método de Dunnett

| mg/L COBRE | Test de Dunnett. Valores de <i>t</i> -calculados | | | | | <i>T</i> crítica para 22 grados de libertad y 10 concentraciones |
|------------|--|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|---|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 0,20 | 0,19 | -0,13 | 0,42 | 1,53 | 2,63 | 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 0,39 | 1,31 | 1,47 | 1,86 | 2,31 | 4,15 (*) | |
| 0,78 | 5,43 (*) | 11,38 (*) | 2,83 (*) | 5,68 (*) | 5,92 | |
| 1,56 | 24,88 | 19,27 | 3,70 | 26,24 | 7,29 | |
| 3,13 | 23,92 | 22,54 | 6,46 | 34,18 | 12,25 | |
| 6,25 | 23,41 | 23,41 | 10,24 | 33,35 | 16,97 | |
| 12,5 | 22,30 | 24,80 | 11,26 | 33,25 | 19,20 | |
| 25,0 | 22,95 | 26,25 | 12,57 | 32,94 | 17,95 | |
| 50,0 | 24,34 | 29,70 | 13,01 | 33,62 | 18,95 | |
| 100,0 | 22,74 | 30,96 | 13,85 | 34,08 | 19,62 | |

Tabla C III.44. t calculados del ensayo de COBRE y microalgas marinas (t=96 h). Método de Dunnett

| mg/L COBRE | Test de Dunnet. Valores de t-calculados | | | | | T crítica para 22 grados de libertad y 10 concentraciones |
|---------------|---|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|---|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 0,20 | 1,88 | 3,47 (*) | 0,70 | 0,91 | 1,37 | 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 0,39 | 4,47 (*) | 8,47 | 1,65 | 1,68 | 3,67 (*) | |
| 0,78 | 10,95 | 20,77 | 2,92 (*) | 2,55 | 4,11 | |
| 1,56 | 58,80 | 32,21 | 3,87 | 14,79 (*) | 5,66 | |
| 3,13 | 57,18 | 36,82 | 7,45 | 19,79 | 10,35 | |
| 6,25 | 56,15 | 38,53 | 11,93 | 19,29 | 14,92 | |
| 12,5 | 54,02 | 39,72 | 12,98 | 19,22 | 16,76 | |
| 25,0 | 54,65 | 41,41 | 15,35 | 19,55 | 16,51 | |
| 50,0 | 57,56 | 44,33 | 14,90 | 19,55 | 18,25 | |
| 100,0 | 56,17 | 47,83 | 15,86 | 22,22 | 18,75 | |

La siguiente tabla muestra un resumen de los resultados umbrales obtenidos:

Tabla C III.45. Valores NOEC y LOEC obtenidos en el ensayos del COBRE y las microalgas marinas

| | Microalgas Marinas | | | | |
|-------------|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> |
| 72 h | | | | | |
| NOEC | 0,39 | 0,39 | 0,39 | 0,39 | 0,20 |
| LOEC | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,78 | 0,39 |
| 96 h | | | | | |
| NOEC | 0,20 | < 0,20 | 0,39 | 0,78 | 0,20 |
| LOEC | 0,39 | 0,20 | 0,78 | 1,56 | 0,39 |

Los resultados obtenidos indican que respecto a los efectos umbrales, el alga más sensible a las 72 horas de exposición es *T. chuii* determinándose mediante el test de Dunnett una LOEC de 0,20 mg/L y por tanto una NOEC de 0,39 mg/L. Para el periodo de 96 hora, *I. galbana* es el alga más sensible obteniéndose una LOEC de 0,20 mg/L (no se determina experimentalmente la concentración de efectos mínimos observados).

En función de estos efectos umbrales, el alga más resistente es *C. gracilis* a las 96 horas de exposición.

DETERMINACIÓN DE LOS IC_p

Los resultados de los valores medios de los IC_p calculados para cada una de las algas se muestra en la tabla siguiente.

Tabla C III.46. IC_p calculados en el ensayo de COBRE y microalgas marinas

| t (h) | Expresión de toxicidad | Valores de IC _p | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|------------------------|----------------------------|-------|------|-------------------|-------|-------|------------------|-------|--------|--------------------|-------|------|-----------------|-------|--------|
| | | <i>N. gaditana</i> | | | <i>I. galbana</i> | | | <i>D. salina</i> | | | <i>C. gracilis</i> | | | <i>T. chuii</i> | | |
| | | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES |
| 72 | IC ₅ | -0,16 | 0,30 | 0,62 | 0,25 | 0,36 | 0,44 | -0,10 | 0,24 | 0,84 | -0,02 | 0,21 | 0,77 | 0,02 | 0,09 | 0,29 |
| | IC ₂₅ | 0,45 | 0,74 | 0,99 | 0,56 | 0,61 | 0,66 | -0,77 | 1,34 | 2,99 | 0,45 | 0,81 | 1,01 | -0,57 | 0,99 | 2,49 |
| | IC ₅₀ | 0,88 | 1,03 | 1,17 | 0,91 | 1,04 | 1,16 | 1,98 | 3,60 | 5,17 | 0,91 | 1,07 | 1,19 | 1,91 | 2,55 | 3,07 |
| | IC ₇₅ | 1,22 | 1,29 | 1,37 | 2,13 | 2,45 | 2,92 | 2,97 | 8,65 | 13,39 | 1,24 | 1,32 | 1,39 | 4,02 | 4,91 | 5,60 |
| | IC ₉₅ | 1,49 | 1,51 | 1,52 | 15,55 | 31,02 | 44,68 | 53,95 | 80,79 | 108,56 | 1,49 | 1,53 | 1,57 | 0,00 | 57,69 | 0,00 |
| 96 | IC ₅ | 0,00 | 0,25 | 0,59 | 0,05 | 0,12 | 0,20 | -0,09 | 0,23 | 0,86 | 0,05 | 0,15 | 0,37 | 0,00 | 0,10 | 0,47 |
| | IC ₂₅ | 0,72 | 0,81 | 0,89 | 0,39 | 0,45 | 0,50 | -0,30 | 1,48 | 2,81 | 0,63 | 0,83 | 0,96 | -0,80 | 1,11 | 2,64 |
| | IC ₅₀ | 1,01 | 1,06 | 1,11 | 0,66 | 0,79 | 0,93 | 2,29 | 3,36 | 4,41 | 0,99 | 1,08 | 1,17 | -0,73 | 1,11 | 2,68 |
| | IC ₇₅ | 1,29 | 1,31 | 1,34 | 1,43 | 1,48 | 1,53 | 5,22 | 6,33 | 10,37 | 1,27 | 1,33 | 1,39 | 3,95 | 4,93 | 5,75 |
| | IC ₉₅ | 1,51 | 1,51 | 1,52 | 5,41 | 11,07 | 23,14 | 19,35 | 26,42 | 81,95 | 1,49 | 1,53 | 1,58 | 0,06 | 36,04 | 107,79 |

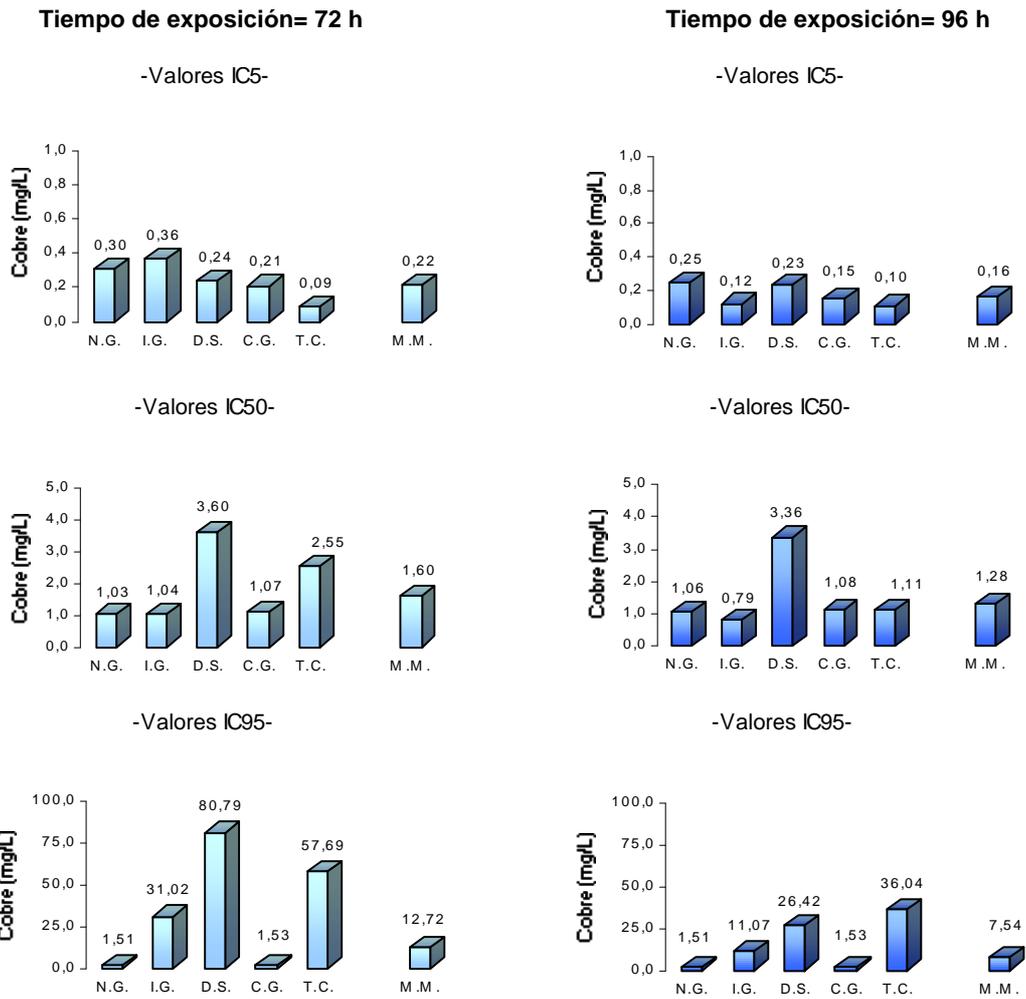
Método *bootstrap*. Valores medios; ICEI: Intervalo de confianza expandido inferior; ICEI: Intervalo de confianza expandido superior

En las gráficas mostradas en la Figura C III.43. se representan los valores de IC₅, IC₅₀ e IC₉₅ a las 72 y 96 h de exposición obtenidos en los ensayos de cobre y las cinco especies de microalgas de ensayo. La última columna de cada gráfico representa la media geométrica de los valores de IC_p obtenidos para cada microalga. En la Figura C III.44. se representa una clasificación de las algas en función de la sensibilidad/resistencia a este tóxico.

Respecto a los resultados obtenidos por las algas en ambos periodos de exposición se observa en general un aumento de la sensibilidad de las algas al tóxico a las 96 horas de exposición. Para las concentraciones de IC₅ e IC₅₀ estas variaciones no son muy acusadas, sin embargo, para IC₉₅ las diferencias son considerables para algunas algas como por ejemplo para *D. salina* la cual presenta una IC₉₅ a las 72 horas de 80,79 mg/L y a las 96 horas de 26,42 mg/L.

Respecto a la clasificación de las algas, no existe una tendencia general que defina qué alga es la más resistente o cual es la más sensible. Observando los valores y la posición relativa de las algas en la clasificación puede decirse que *N. gaditana*, *C. gracilis* e *I. galbana* son las que presentan una mayor sensibilidad, mientras que *D. salina* y *T. chuii* son las que presentan una mayor resistencia al cobre.

Ensayo de toxicidad del COBRE



N.G.: *N. gaditana*; I.G.: *I. galbana*; D.S.: *D. salina*; C.G.: *C. gracilis*; T.C.: *T. chuii*; M.M.: Microalgas Marinas (valores correspondiente a la media geométrica de los valores obtenidos para las cinco algas de ensayo)

Figura C III.43. Resultados de IC₅, IC₅₀ e IC₉₅ del ensayo de toxicidad del COBRE con 5 microalgas marinas para periodos de exposición de 72 y 96 horas

| | | <u>IC5</u> | <u>IC50</u> | <u>IC95</u> |
|------|----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 72 h | + sensibilidad | <i>T. chuii</i> | <i>N. gaditana</i> | <i>N. gaditana</i> |
| | ↑ | <i>C. gracilis</i> | <i>I. galbana</i> | <i>C. gracilis</i> |
| | | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>I. galbana</i> |
| | ↓ | <i>N. gaditana</i> | <i>T. chuii</i> | <i>T. chuii</i> |
| | - sensibilidad | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>D. salina</i> |
| | | <u>IC5</u> | <u>IC50</u> | <u>IC95</u> |
| 96 h | + sensibilidad | <i>T. chuii</i> | <i>I. galbana</i> | <i>N. gaditana</i> |
| | ↑ | <i>I. galbana</i> | <i>N. gaditana</i> | <i>C. gracilis</i> |
| | | <i>C. gracilis</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>I. galbana</i> |
| | ↓ | <i>D. salina</i> | <i>T. chuii</i> | <i>D. salina</i> |
| | - sensibilidad | <i>N. gaditana</i> | <i>D. salina</i> | <i>T. chuii</i> |

Figura C III.44. Sensibilidad de las especies de microalgas frente a cobre

Respecto a la comparación de resultados con datos bibliográficos (Anexo VI), existen varias referencias acerca de la toxicidad del cobre en microalgas. Moreno Garrido (1997) determina para *R. salina* una IC_{50} a las 72 horas de exposición de 0,07 mg/L. Otros autores encuentran diferentes valores de toxicidad del cobre en algas en función del pH del medio. Para *Aphanizomenon graciles* se mide una inhibición prácticamente completa en el rango de 0,064 a 0,2 mg/L de cobre en el rango de pH de 8,2 a 5,1. Para este mismo rango de pH se observa una completa inhibición en el alga *Oscillatoria redekei* (Moreno Garrido, 1997). Los resultados obtenidos en el presente estudio son ligeramente superiores a las referencias con algas, sin embargo, consultando la tabla A VI.1. de los anexos puede observarse que los resultados obtenidos son comparables con los resultados de toxicidad documentados para otro tipo de organismos.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Los resultados obtenidos para las cinco microalgas son los siguientes:

| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> |
|----------------------------|--|--|------------------|--|-----------------|
| Concentración alguistática | No se ha determinado experimentalmente | No se ha determinado experimentalmente | 12,5 mg/L | No se ha determinado experimentalmente | 12,5 mg/L |
| Concentración alguicida | 12,5 mg/L | 12,5 mg/L | 25,0 mg/L | 12,5 mg/L | 25,0 mg/L |

Para el cálculo de las concentraciones experimentales para estos niveles de efecto, sólo se realizó la experiencia con las cuatro mayores concentraciones de ensayo (100, 50, 25 y 12,5 mg/L de Cu (II)). Para las algas *N. gaditana*, *I. galbana* y *C. gracilis*, no se observó un aumento de biomasa en ninguno de los tratamientos, por ello, la menor concentración es la que define la concentración alguicida. Para *D. salina* y *T. chuii*, sí se observó un leve aumento de biomasa en los tratamientos correspondientes a 12,5 mg/L por tanto, esta concentración se definió como alguistática para estas algas. Ambas algas se definen de nuevo como las más resistentes al cobre.

CONSIDERACIONES ADICIONALES SOBRE LOS VALORES NOEC, IC_p Y ALGUICIDAS

Para el nivel de efecto umbral existen algunos resultados los cuales hay que interpretarlos con precaución. Estos son los siguientes:

- ⊗ Valores de IC_5 de *N. gaditana* a las 72 h.
- ⊗ Valores de IC_5 de *I. galbana* a las 72 h.
- ⊗ Valores de IC_5 de *D. salina* a las 72 y 96 h.
- ⊗ Valores de IC_5 de *C. gracilis* a las 72 y 96 h.
- ⊗ Valores de IC_5 de *T. chuii* a las 72 y 96 h.

En los ensayos con cobre, algunas concentraciones IC_{95} deben interpretarse con precaución puesto que la estimación realizada por el programa ICpin para este porcentaje de efecto es superior a las concentraciones alguicidas determinadas de forma experimental. Estas son las siguientes:

- ⊗ Valores de IC_{95} de *I. galbana* a las 72 h.
- ⊗ Valores de IC_{95} de *D. salina* a las 72 y 96 h.
- ⊗ Valores de IC_{95} de *T. chuii* a las 72 y 96 h.

4.1.5.2. ENSAYOS CON CRUSTÁCEOS. ARTEMIA

Previamente al ensayo definitivo, se realizó un ensayo preliminar en las mismas concentraciones utilizadas con las microalgas marinas (100 a 0,2 mg/L). Los resultados mostraron una alta mortalidad para las concentraciones entre 100 a 25 mg/L por lo que se decidió bajar este rango al que se muestra en la siguiente tabla:

| <u>Especie</u> | <u>Concentración de COBRE (mg/L)</u> | | | | | | | | | | |
|----------------|--------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| <i>Artemia</i> | 0,0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 6,0 | 7,0 | 8,0 | 9,0 | 10,0 |

La siguiente gráfica muestra una representación de los porcentajes de supervivientes obtenidos en cada periodo de ensayo.

La figura muestra como transcurridas 24 horas de ensayo no se observaron resultados de mortalidad significativos, mostrando todas las concentraciones un porcentaje muy elevado de supervivientes. Sí se observó que las concentraciones más altas presentaban un cierto número de organismos afectados en su capacidad natatoria (tablas A VI.23. y A VI.24. del Anexo VI). Esta respuesta puede ser subjetivas en la mayoría de las ocasiones ya que depende del criterio del observador, por lo que si bien pueden servir para estudiar la evolución del ensayo, la interpretación en datos numéricos debe realizarse con precaución (Abel y Axiac, 1991; Rand, 1995). Para los propósitos de este estudio, no se considerarán estas respuestas y por tanto, no se obtienen resultados de toxicidad para este periodo de exposición.

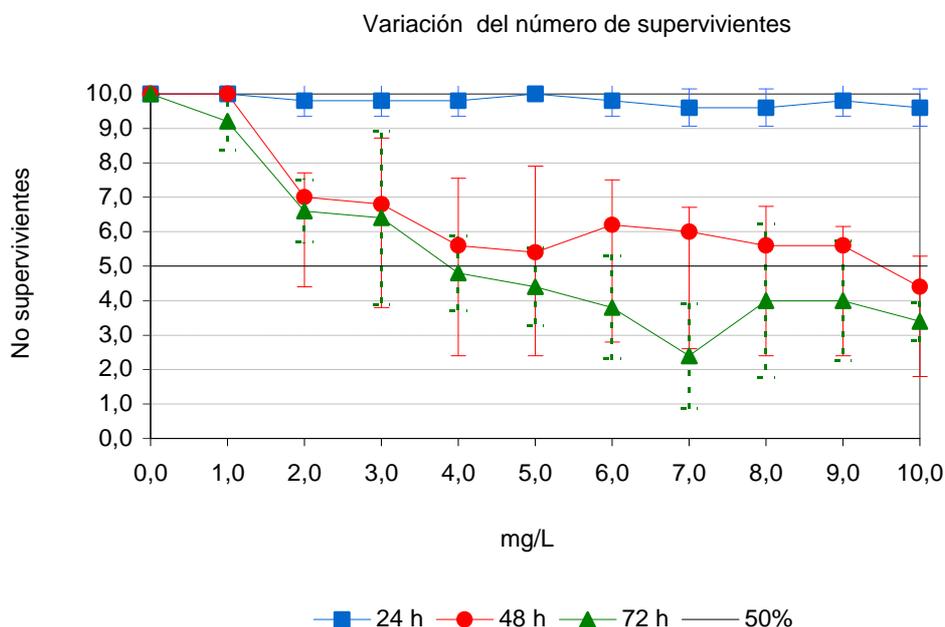


Figura C III.44. variación del número de supervivientes del ensayo de toxicidad del COBRE y *Artemia*

DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES

De forma gráfica se establece la concentración de efectos mínimos observados en 2 mg/L a las 48 horas y de 1 mg/L a las 72 horas de exposición. Por tanto, para las 48 horas la concentración de no efecto se establece en 1 mg/L, y para las 72 horas no se determina experimentalmente esta concentración umbral.

DETERMINACIÓN DE LOS EC(p)

Método de interpolación gráfica

Mediante el método de interpolación gráfica, se han determinado los valores de LC₅₀ para cada periodo de exposición. Los resultados fueron los siguientes:

| Cobre (mg/L) | 48 h | 72 h |
|------------------|------|------|
| LC ₅₀ | 9,50 | 3,88 |

Método Probit

Las siguiente tabla muestra los valores medios para diversos LC(p) obtenidos mediante el método Probit.

Tabla CIII.47. Resultados de diferentes LC(p) obtenidos mediante el método Probit

| | 48 h | 72 h |
|-------------|---------|---------|
| LC/EC 1,00 | 0,141 | 0,147 |
| LC/EC 5,00 | 0,468 | 0,403 |
| LC/EC 10,00 | 0,887 | 0,689 |
| LC/EC 15,00 | 1,365 | 0,990 |
| LC/EC 50,00 | 8,471 | 4,575 |
| LC/EC 85,00 | 52,557 | 21,148 |
| LC/EC 90,00 | 80,943 | 30,379 |
| LC/EC 95,00 | 153,479 | 51,958 |
| LC/EC 99,00 | 509,589 | 142,169 |

χ^2 calculado (48 h)= 15,872; χ^2 calculado (72 h)= 13,014; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza para t=48 h. Los resultados hay que interpretarlos con precaución (Notación del programa Probit)

La gráfica muestra estos valores medios con sus intervalos de confianza.

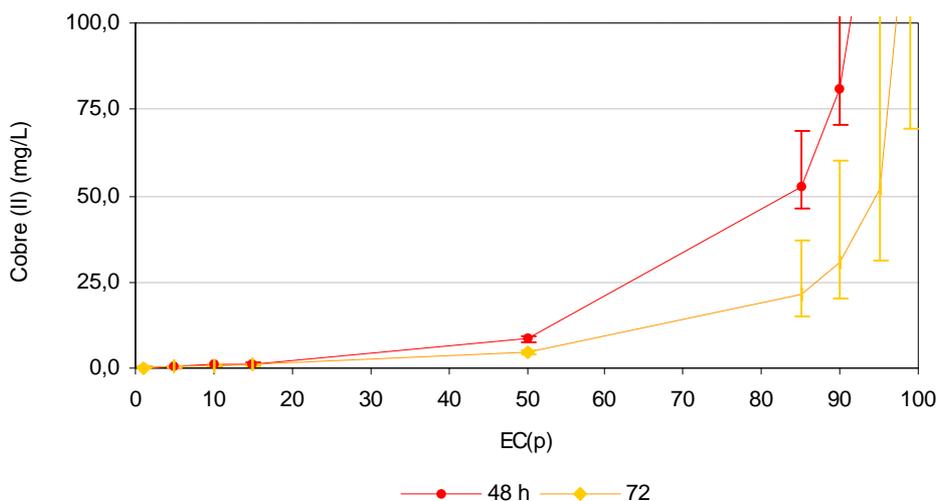


Figura C III.45. Valores de EC(p) calculados mediante el método Probit

Las LC₅₀ obtenidas mediante el método Probit son 8,471 y 4,575 mg/L para los periodos de 48 y 72 horas respectivamente. Significar los estrechos intervalos de confianza de la LC₅₀ mostrados en la figura anterior.

Respecto a referencias ecotoxicológicas de este compuesto con organismos acuáticos, en el Anexo VI se resumen gran número de resultados. Para *Artemia* no se han encontrado referencias bibliográficas pero sí se para otros crustáceos en el rango de 0,049 a 250 mg/L. Para peces los resultados encontrados son muy similares a los obtenidos para *Artemia* oscilando entre 1,0 a 6,5 mg/L (Ramamoorthy y Baddaloo, 1995).

4.1.5.3. ENSAYOS CON BACTERIAS MARINAS. VIBRIO FISCHERI

En función de resultados preliminares, hubo que aumentar considerablemente el rango de concentraciones de ensayo con respecto a los utilizados con los otros organismos de ensayo. La siguiente tabla muestra este rango:

| <u>Especie</u> | <u>Concentración de COBRE (mg/L)</u> | | | | | | | | |
|------------------------|--------------------------------------|-------|--------|-------|------|-----|-----|-----|------|
| <i>Vibrio fischeri</i> | 0,000 | 7,813 | 15,625 | 31,25 | 62,5 | 125 | 250 | 500 | 1000 |

La siguiente gráfica muestra la representación de los diversos porcentajes de inhibición obtenidos para cada concentración.

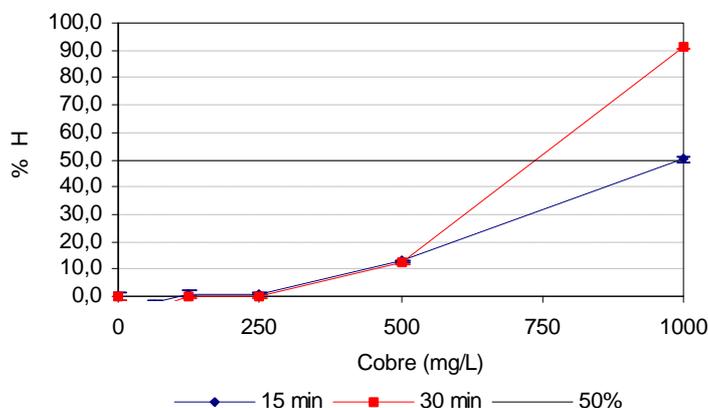


Figura C III.46. Variación de la inhibición del crecimiento con la concentración en el ensayo de toxicidad del COBRE y *Vibrio fischeri*

Para calcular el valor de las EC(p) se linealizó la curva de inhibición de la bioluminiscencia convirtiendo los valores de porcentaje de inhibición en valores γ (EC₅₀ para $\gamma=1$, EC₂₅ para $\gamma=0,5$, y EC₅ para $\gamma=0,1$).

Los resultados de EC₅₀ obtenidos mediante el método de interpolación gráfica fueron los siguientes:

Tabla C III.47. EC(p) obtenidos mediante el método de interpolación gráfica en el ensayo de toxicidad del cobre y *Vibrio fischeri*

| | <i>t=15 min</i> | <i>t=30 min</i> |
|------------------|-----------------|-----------------|
| EC ₅ | 385,0 | 395,0 |
| EC ₂₅ | 711,2 | 518,9 |
| EC ₅₀ | 1000 | 543,8 |

Para este compuesto, no se han documentado referencias bibliográficas que permitan comparar las concentraciones obtenidas por otros autores en el ensayo de inhibición de la luminiscencia. Comparando los resultados obtenidos en este ensayo con otros resultados de toxicidad se puede decir que los resultados obtenidos son muy elevados respecto a ensayos con otros organismos por lo que no se utilizarán en el posterior desarrollo de criterios de calidad ambiental.

4.1.5.4. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL ENSAYO DEL COBRE

A partir de los resultados obtenidos con los tres taxones de ensayo se obtienen las siguientes conclusiones generales:

Resultados con microalgas:

- i) Los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad con cinco microalgas y cobre demuestran que el diseño experimental y las medidas de biomasa obtenidas en función de la turbidez de la muestra, permiten obtener un conjunto de resultados de toxicidad coherentes, si bien, se propone ampliar el estudio realizado en el rango de 0,78 a 3,13 mg/L.
- ii) Los diferentes resultados obtenidos en cada nivel de efecto (umbral, inhibición parcial del crecimiento y niveles alguicidas) permiten afirmar que la toxicidad del cobre depende de la especie de ensayo. Para algunas algas, la similitud entre los valores obtenidos a las 72 y 96 horas indican que el tiempo de exposición no es un factor influyente en los resultados. Para otras algas, la concentración obtenida sí varía considerablemente dependiendo del periodo de exposición
- iii) La menor NOEC obtenida es de 0,20 mg/L de cobre.
- iv) Los valores de IC₅₀ obtenidos para las diferentes especies varían entre 1,03 y 3,60 mg/L a las 72 horas, y entre 0,79 y 3,36 mg/L a las 96 horas de exposición.
- v) En función de la IC₅₀ se obtiene la siguiente escala de sensibilidad al tóxico:



- vi) Respecto al nivel alguicida, se han podido determinar estos niveles para todas las especies ensayadas. La concentración alguicida más baja obtenida ha sido 12,5 mg/L.

Resultados con *Artemia*:

- vii) Los resultados obtenidos tanto en el control como en las concentraciones de ensayo permiten afirmar que el diseño experimental ha sido correcto obteniéndose resultados coherentes y dentro de los rangos bibliográficos, si bien, y al objeto de poder ampliar los resultados al periodo de 24 horas, sería conveniente ampliar el rango de ensayo hacia concentraciones más altas.
- viii) La concentración de no-efecto mas pequeña observada ha sido 1 mg/L. La LC₅₀ obtenida a las 72 horas es de 3,88 mg/L.

Resultados con *Vibrio fischeri*:

- ix) En este ensayo se obtuvieron valores excesivamente elevados.

Resultados comparativos:

Comparando los resultados obtenidos en los diferentes niveles de efectos para los tres taxones, se obtiene que las algas son los organismos que presentan una mayor toxicidad al cobre. Las bacterias fueron los organismos más resistentes.

4.1.6. TOXICIDAD DEL CADMIO (II)

Para la realización del ensayo con cadmio se realizó una variación en el medio nutriente utilizado consistente en la supresión del compuesto AEDT-Na₂.

En los apartados siguientes, se resumen y comentan los resultados más relevantes obtenidos en los ensayos de toxicidad con cadmio. En el Anexo VII del presente documento, se encuentran detallados las condiciones de ensayo, mediciones de biomasa, cálculos realizados, así como otro tipo de información complementaria (propiedades físicas y químicas del compuesto y referencias ecotoxicológicas obtenidas por diversos autores).

4.1.6.1. ENSAYOS CON MICROALGAS MARINAS

Las concentraciones de ensayo seleccionadas para el ensayo con cadmio fueron las siguientes:

| Especies | Concentración de cadmio (mg/L) | | | | | | | | | | |
|--------------------|---------------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|--------|
| Microalgas marinas | 0,0 | 0,20 | 0,39 | 0,78 | 1,56 | 3,13 | 6,25 | 12,50 | 25,00 | 50,00 | 100,00 |

En la figura C III.47. se muestra la evolución temporal de la concentración de biomasa normalizada de los ensayos de toxicidad del cadmio y las microalgas marinas.

Las curvas de crecimiento obtenidas en estos ensayos muestran la respuesta de las algas frente a diferentes concentraciones de cadmio. En función de la forma que toman las diferentes curvas puede decirse que *N. gaditana* y *C. gracilis* presentan un comportamiento diferente al resto de microalgas. A partir de la pendiente que muestran las diferentes curvas puede presuponerse que ambas algas son las más sensibles ya que la concentración inferior de cadmio ensayada muestra una inhibición importante respecto a la población control. Para ambas algas, se apunta la necesidad de ampliar el estudio de toxicidad ensayando con concentraciones inferiores a las seleccionadas.

El resto de microalgas muestran un amplio rango de respuestas en el rango de concentraciones de ensayo.

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo

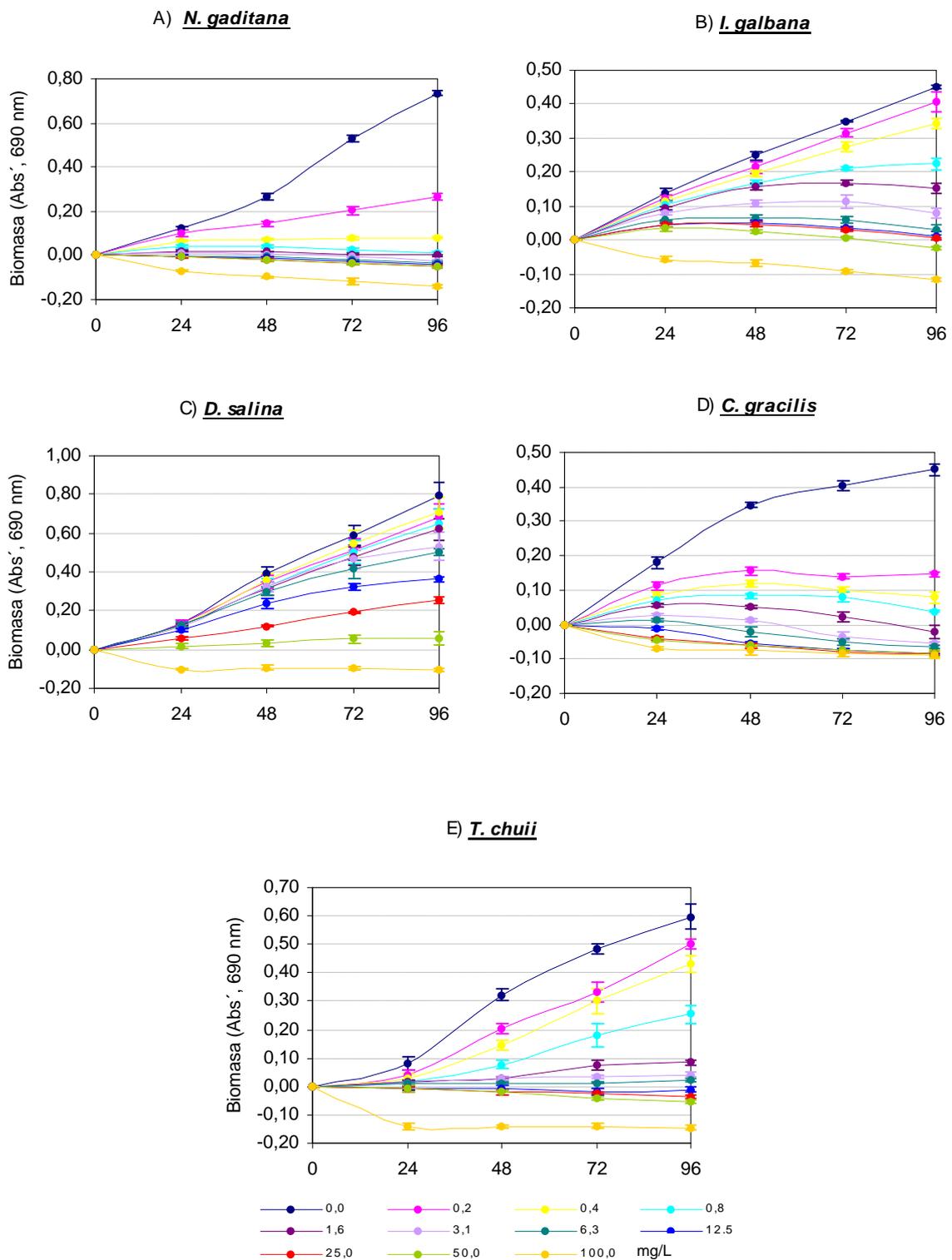


Figura C III.47. Evolución de la concentración de biomasa normalizada en el ensayo de toxicidad del CADMIO y microalgas marinas

En la figura C III.48. se muestra la variación de la concentración de biomasa normalizada en el rango de concentraciones de ensayo para cada periodo de exposición. Con objeto de visualizar mejor los resultados y puesto que las concentraciones de ensayo están seleccionadas en un amplio rango de concentraciones (0,01 a 50 mg/L), el eje-x se ha construido en escala logarítmica.

Las curvas muestran como para *N. gaditana* y *T. chuii* el rango de concentraciones de ensayo es crítico puesto que prácticamente todas de las concentraciones ensayadas se encuentran totalmente inhibidas por el tóxico. *I. galbana* y *D. salina* muestran una amplia gama de concentraciones de biomasa obteniéndose la forma sigmoideal habitual en estas curvas. Para *D. salina*, el extremo inferior no aparece mientras que para *I. galbana*, si se pueden apreciar varias concentraciones muy inhibidas y justo en el extremo, los valores de biomasa de los tratamientos de 100 mg/L en los cuales se ha producido una importante muerte de la población.

C. gracilis muestra un comportamiento intermedio a los anteriormente descritos. No aparecen resultados próximos a los controles, pero sí se observa un tramo de pendiente acusada, y un extremo inferior con bajos valores de biomasa normalizada indicando una fuerte inhibición e incluso muerte de la población.

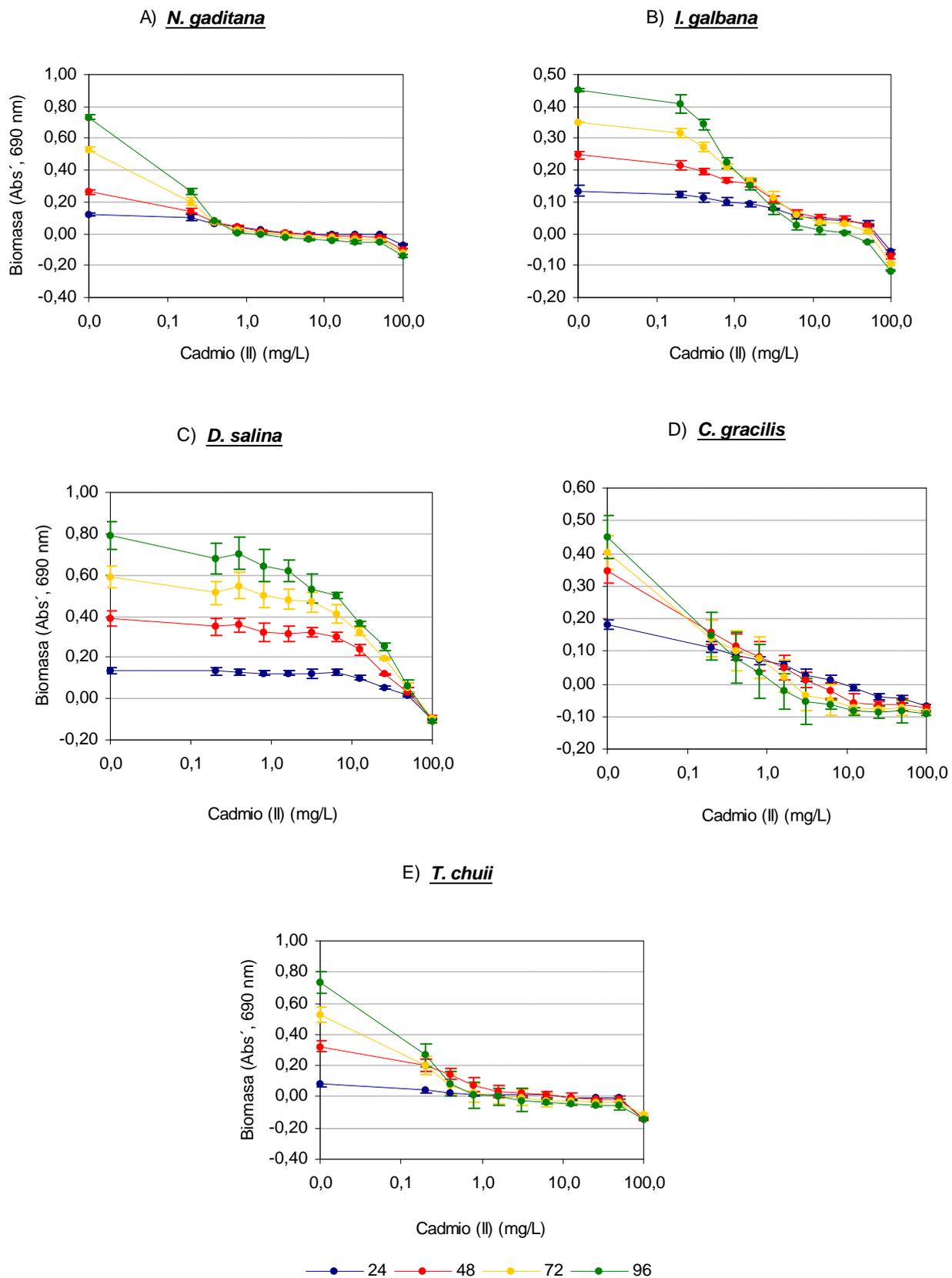


Figura C III.48. Variación de la concentración de biomasa normalizada con la concentración de CADMIO

OBTENCIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES

Se ensayó la normalidad de la distribución de resultados de crecimiento mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza mediante el test de Barlett. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla C III.48. W calculados del ensayo de CADMIO y microalgas marinas. Test de Shapiro Wilk

| Periodo de exposición | Test de Shapiro Wilk. W calculados | | | | | W crítico para N=33 y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 24 h | 0,965 | 0,977 | 0,967 | 0,960 | 0,971 | 0,931 |
| 48 h | 0,970 | 0,946 | 0,954 | 0,980 | 0,979 | |
| 72 h | 0,969 | 0,970 | 0,967 | 0,970 | 0,950 | |
| 96 h | 0,980 | 0,960 | 0,975 | 0,954 | 0,934 | |
| | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | |

Como puede observarse, todos los ensayos y en todos los periodos de exposición se cumplió la condición de normalidad de la distribución de resultados.

Tabla C III.49. B calculados del ensayo de CADMIO y microalgas marinas. Test de Barlett

| Periodo de exposición | Test de Barlett. B calculados | | | | | B crítico para 10 grados de libertad y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|--|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 24 h | 17,77 | 8,91 | 5,17 | 8,33 | 9,81 | 18,31 |
| 48 h | 14,20 | 2,72 | 8,11 | 10,03 | 13,08 | |
| 72 h | 13,31 | 15,52 | 12,65 | 13,73 | 17,25 | |
| 96 h | 10,48 | 15,99 | 16,04 | 14,78 | 16,83 | |
| | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | |

Los resultados indican homogeneidad de la varianza en todos los casos.

Los resultados obtenidos de la aplicación del test de Dunnett fueron los siguientes:

Tabla C III.50. t calculados del ensayo de CADMIO y microalgas marinas (t=72 h). Método de Dunnett

| mg/L CADMIO | Test de Dunnett. Valores de t-calculados | | | | | T crítica para 22 grados de libertad y 10 concentraciones |
|-------------|--|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|---|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 0,20 | 43,83 (*) | 4,23 (*) | 2,11 | 32,95 (*) | 9,55 (*) | 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 0,39 | 60,76 | 9,53 | 1,16 | 37,78 | 11,42 | |
| 0,78 | 67,80 | 17,28 | 2,46 | 40,48 | 18,14 | |
| 1,56 | 70,08 | 22,62 | 3,03 (*) | 47,60 | 25,27 | |
| 3,13 | 72,10 | 29,58 | 3,40 | 54,59 | 27,98 | |
| 6,25 | 74,16 | 36,00 | 4,91 | 56,54 | 29,30 | |
| 12,5 | 74,66 | 39,11 | 7,37 | 59,58 | 30,98 | |
| 25,0 | 76,09 | 39,77 | 11,05 | 59,96 | 31,27 | |
| 50,0 | 76,27 | 42,63 | 14,86 | 59,54 | 32,40 | |
| 100,0 | 86,04 | 55,06 | 19,11 | 61,04 | 38,50 | |

Tabla C III.51. t calculados del ensayo de CADMIO y microalgas marinas (t=96 h). Método de Dunnett

| mg/L CADMIO | Test de Dunnet. Valores de t -calculados | | | | | T crítica para 22 grados de libertad y 10 concentraciones |
|----------------|--|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|---|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 0,20 | 69,02 (*) | 3,74 (*) | 2,59 | 33,28 (*) | 5,47 (*) | 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 0,39 | 96,43 | 9,19 | 2,01 | 40,71 | 9,59 | |
| 0,78 | 106,80 | 19,21 | 3,34 (*) | 45,24 | 20,12 | |
| 1,56 | 108,22 | 25,05 | 3,91 | 51,79 | 30,19 | |
| 3,13 | 111,66 | 31,36 | 5,87 | 55,37 | 32,66 | |
| 6,25 | 113,38 | 35,55 | 6,55 | 56,43 | 33,74 | |
| 12,5 | 114,27 | 36,92 | 9,68 | 58,52 | 35,74 | |
| 25,0 | 115,79 | 37,56 | 12,20 | 58,74 | 37,17 | |
| 50,0 | 116,08 | 39,96 | 16,55 | 58,55 | 38,19 | |
| 100,0 | 128,86 | 47,70 | 20,27 | 59,21 | 43,66 | |

La siguiente tabla resume los resultados umbrales obtenidos:

Tabla C III.52. Valores NOEC y LOEC obtenidos en el ensayos del CADMIO y las microalgas marinas

| | Microalgas Marinas | | | | |
|------|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> |
| 72 h | | | | | |
| NOEC | --- | --- | 0,78 | --- | --- |
| LOEC | 0,20 | 0,20 | 1,56 | 0,20 | 0,20 |
| 96 h | | | | | |
| NOEC | --- | --- | 0,39 | --- | --- |
| LOEC | 0,20 | 0,20 | 0,78 | 0,20 | 0,20 |

Los resultados umbrales obtenidos confirman las observaciones realizadas anteriormente. Las tres algas más sensibles son *N. gaditana*, *C. gracilis* y *T. chuii*. La más resistente al cadmio es *D. salina* seguida de *I. galbana*.

Hay que notar los altos valores de "t" que se obtienen para *N. gaditana* y *T. chuii* lo que confirma que el rango de concentraciones no es muy adecuado para estas algas.

DETERMINACIÓN DE LOS IC_p

Los resultados de los valores medios de los IC_p calculados para cada una de las algas se resumen en la tabla siguiente.

Tabla C III.53. IC_p calculados en el ensayo de CADMIO y microalgas marinas

| t (h) | Expresión de toxicidad | Valores de IC _p | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|------------------------|----------------------------|-------|------|-------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|--------------------|-------|------|-----------------|-------|------|
| | | <i>N. gaditana</i> | | | <i>I. galbana</i> | | | <i>D. salina</i> | | | <i>C. gracilis</i> | | | <i>T. chuii</i> | | |
| | | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES |
| 72 | IC ₅ | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,04 | 0,10 | 0,23 | 0,01 | 0,20 | 1,75 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,03 | 0,05 |
| | IC ₂₅ | 0,07 | 0,08 | 0,09 | 0,34 | 0,46 | 0,60 | -2,13 | 4,41 | 10,89 | 0,07 | 0,07 | 0,08 | 0,10 | 0,16 | 0,24 |
| | IC ₅₀ | 0,14 | 0,16 | 0,18 | 1,26 | 1,44 | 1,80 | 9,57 | 15,23 | 20,00 | 0,14 | 0,15 | 0,16 | 0,37 | 0,57 | 0,74 |
| | IC ₇₅ | 0,27 | 0,31 | 0,34 | 2,79 | 4,57 | 2,79 | 28,04 | 33,03 | 38,49 | 0,32 | 0,41 | 0,63 | 0,62 | 1,20 | 1,46 |
| | IC ₉₅ | 0,67 | 0,77 | 0,94 | 32,14 | 38,44 | 44,11 | 38,51 | 71,97 | 88,55 | 1,08 | 1,77 | 2,91 | 3,53 | 4,39 | 5,26 |
| 96 | IC ₅ | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,02 | 0,11 | 0,33 | 0,02 | 0,12 | 0,98 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,02 | 0,07 | 0,14 |
| | IC ₂₅ | 0,07 | 0,08 | 0,08 | 0,32 | 0,40 | 0,51 | -0,81 | 2,00 | 5,91 | 0,07 | 0,07 | 0,08 | 0,13 | 0,35 | 0,54 |
| | IC ₅₀ | 0,14 | 0,15 | 0,16 | 0,69 | 0,79 | 1,06 | 8,02 | 10,97 | 13,90 | 0,14 | 0,14 | 0,15 | 0,55 | 0,69 | 0,84 |
| | IC ₇₅ | 0,26 | 0,28 | 0,30 | 1,96 | 2,41 | 2,92 | 25,66 | 31,88 | 38,04 | 0,24 | 0,29 | 0,37 | 1,09 | 1,26 | 1,41 |
| | IC ₉₅ | 0,57 | 0,63 | 0,68 | 3,08 | 8,56 | 19,85 | 29,01 | 64,28 | 92,92 | 1,01 | 1,09 | 1,16 | 2,91 | 5,11 | 7,23 |

Método *bootstrap*. Valores medios; ICEI: Intervalo de confianza expandido inferior; ICEI: Intervalo de confianza expandido superior

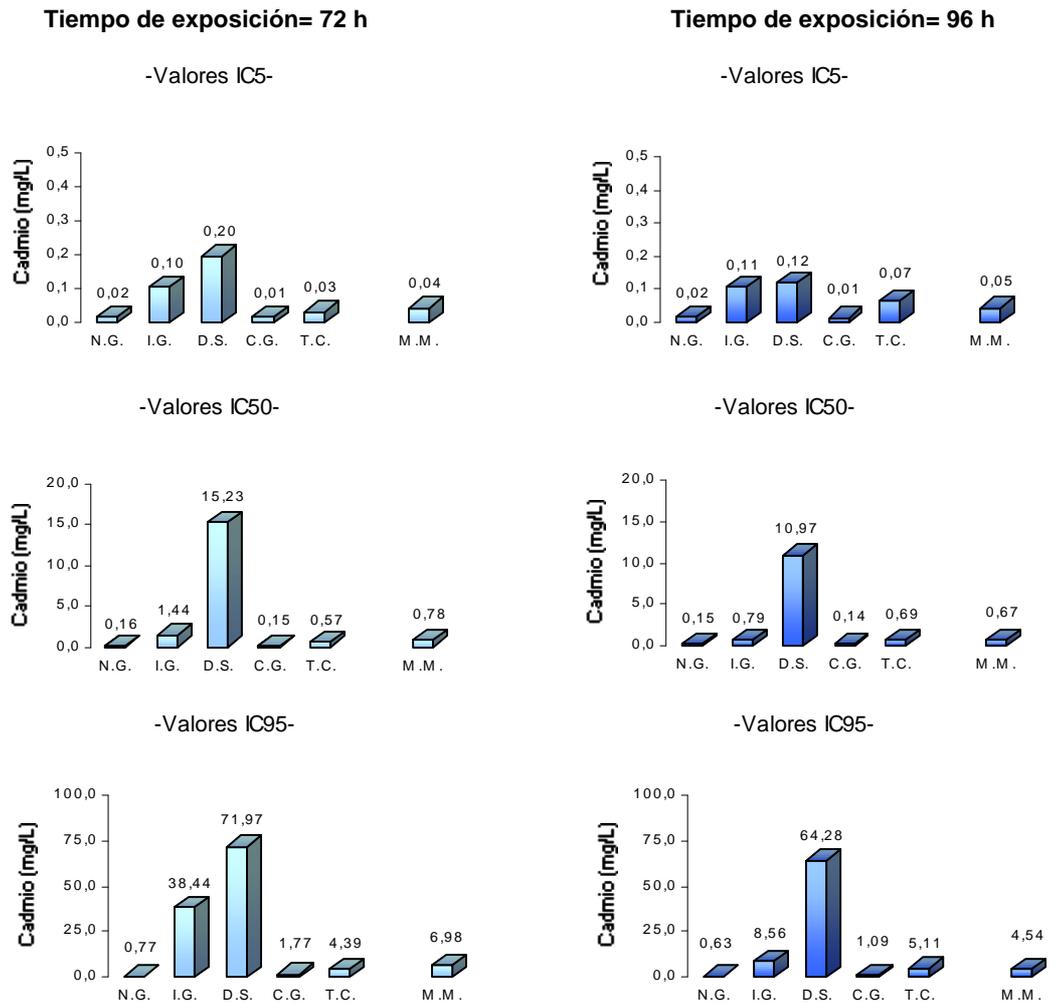
En las gráficas mostradas en la Figura C III.49. se representan los valores de IC₅, IC₅₀ e IC₉₅ a las 72 y 96 h de exposición. En la Figura C III.50. se representa una clasificación de las algas en función de la sensibilidad a este tóxico.

Un aspecto a destacar de estos resultados es los estrechos intervalos de confianza obtenidos en general para cada IC_p, lo cual es indicativo de la exactitud de las concentraciones calculadas.

Respecto a la clasificación de las algas en función de su sensibilidad o su resistencia al tóxico en los periodos de 72 y 96 horas se observa una gran repetitividad en el orden que toman las algas en esta clasificación. Así, para niveles de efecto pequeños (IC₅), las algas más sensibles por orden son *C. gracilis*, *N. gaditana* y *T. chuii*. Las algas más resistentes son *D. salina* e *I. galbana*. Esta clasificación se mantiene para todas las concentraciones de efecto calculadas y para ambos periodos de exposición. La única variación es el orden de las dos algas más sensibles pero las diferencias en las concentraciones son mínimas.

Destacar también los valores obtenidos para *D. salina* los cuales llegan a ser de varios órdenes de magnitud con respecto a otras microalgas de ensayo.

Ensayo de toxicidad del CADMIO



N.G.: *N. gaditana*; I.G.: *I. galbana*; D.S.: *D. salina*; C.G.: *C. gracilis*; T.C.: *T. chuii*;
 M.M.: Microalgas Marinas (valores correspondiente a la media geométrica de los valores obtenidos para las cinco algas de ensayo)

Figura C III.49. Resultados de IC₅, IC₅₀ e IC₉₅ del ensayo de toxicidad del cadmio con 5 microalgas marinas para periodos de exposición de 72 y 96 horas

| | | <u>IC5</u> | <u>IC50</u> | <u>IC95</u> |
|------|----------------|-------------|-------------|-------------|
| 72 h | + sensibilidad | C. gracilis | C. gracilis | N. gaditana |
| | ↑ | N. gaditana | N. gaditana | C. gracilis |
| | ↓ | T. chuii | T. chuii | T. chuii |
| | - sensibilidad | I. galbana | I. galbana | I. galbana |
| | | D. salina | D. salina | D. salina |
| | | <u>IC5</u> | <u>IC50</u> | <u>IC95</u> |
| 96 h | + sensibilidad | C. gracilis | C. gracilis | N. gaditana |
| | ↑ | N. gaditana | N. gaditana | C. gracilis |
| | ↓ | T. chuii | T. chuii | T. chuii |
| | - sensibilidad | I. galbana | I. galbana | I. galbana |
| | | D. salina | D. salina | D. salina |

Figura C III.50. Sensibilidad de las especies de microalgas frente a cadmio

En la bibliografía se han encontrado referencias acerca de la toxicidad del cadmio en microalgas en el rango entre 0,105 y 38,2 mg/L para IC₅₀. Los resultados obtenidos de IC₅₀ en este estudio se encuentran en este rango de toxicidad.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Los resultados obtenidos para las cinco microalgas son los siguientes:

| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> |
|----------------------------|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|
| Concentración alguistática | 0,78 mg/L | 3,13 mg/L | 25,0 mg/L | 3,13 mg/L | 25,0 mg/L |
| Concentración alguicida | 1,56 mg/L | 6,25 mg/L | 50,0 mg/L | 6,25 mg/L | 50,0 mg/L |

Debido a la gran inhibición que mostraron algunas algas, para la determinación de estas concentraciones se ensayo con un gran número de concentraciones. Los resultados mostraron niveles alguicidas muy bajos en comparación con los obtenidos para otros compuestos específicos. Estas concentraciones son críticas para las algas *N. gaditana*, *I. galbana* y *C. gracilis*.

Hay que significar que las concentraciones alguicidas encontradas para estas algas, se encuentran en el rango de concentraciones bibliográficos de IC₅₀.

CONSIDERACIONES ADICIONALES SOBRE LOS VALORES NOEC, IC_P Y ALGUICIDAS

Para el nivel de efecto umbral existen algunos resultados los cuales hay que interpretarlos con precaución. Estos son los siguientes:

- ⊗ Valores de IC₅ de *D. salina* a las 72 y 96 h.

En los ensayos con cadmio (II), algunas concentraciones IC₉₅ deben interpretarse con precaución puesto que la estimación realizada por el programa ICpin para este porcentaje de efecto es superior a las concentraciones alguicidas determinadas de forma experimental. Estas son los siguientes:

- ⊗ Valores de IC₉₅ de *I. galbana* a las 72 y 96 h.
- ⊗ Valores de IC₉₅ de *D. salina* a las 72 y 96 h.

4.1.6.2. ENSAYOS CON CRUSTÁCEOS. ARTEMIA

En este apartado se muestran los resultados de toxicidad obtenidos para *Artemia* expuesta a diversas concentraciones de cadmio.

| <u>Especie</u> | <u>Concentración de CADMIO (mg/L)</u> | | | | | | | | | | | |
|----------------|---------------------------------------|-------|-------|-------|------|------|------|------|-----|-----|-----|--|
| | 0,0 | 0,001 | 0,025 | 0,050 | 0,10 | 0,25 | 0,50 | 0,75 | 1,0 | 2,5 | 5,0 | |
| <i>Artemia</i> | | | | | | | | | | | | |

La siguiente gráfica muestra una representación de los porcentajes de supervivientes obtenidos en cada periodo de ensayo.

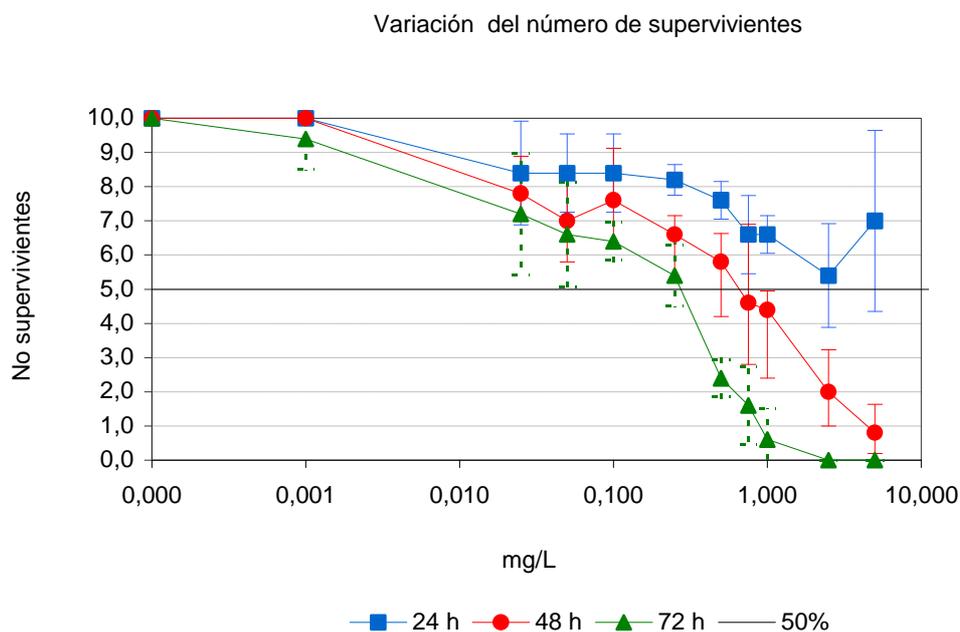


Figura C III.51. variación del número de supervivientes del ensayo de toxicidad del CADMIO y *Artemia*

DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES

Gráficamente, para el ensayo de toxicidad aguda de *Artemia* y el cadmio se establece la LOEC en 0,025 mg/L a las 24 y 48 horas de exposición, y por tanto la NOEC en 0,001 mg/L.

La LOEC a las 72 horas es de 0,001 mg/L. Al ser ésta la menor concentración ensayada, no es posible determinar la concentración de no-efectos observados.

DETERMINACIÓN DE LOS EC(P)

Método de interpolación gráfica

Mediante el método de interpolación gráfica, se han determinado los valores de LC_{50} para cada periodo de exposición. Los resultados fueron los siguientes:

| Cadmio (mg/L) | 24 h | 48 h | 72 h |
|---------------|------|-------|-------|
| LC_{50} | --- | 0,667 | 0,283 |

Método Probit

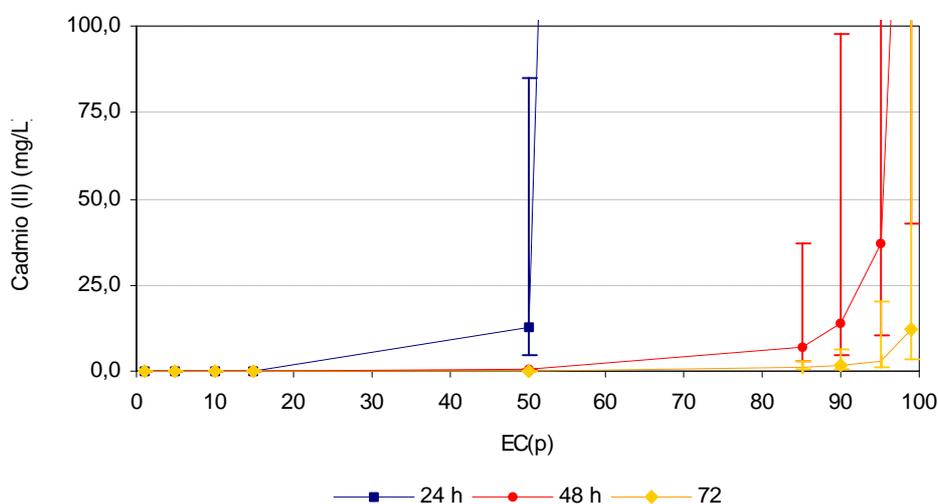
Las siguiente tabla muestras los valores medios para diversos $LC(p)$ obtenidos mediante el método Probit.

Tabla CIII.54. Resultados de diferentes LC(p) obtenidos mediante el método Probit

| | 24 h | 48 h | 72 h |
|-------------|-------------|---------|--------|
| LC/EC 1,00 | 0,000 | 0,001 | 0,001 |
| LC/EC 5,00 | 0,003 | 0,005 | 0,004 |
| LC/EC 10,00 | 0,018 | 0,013 | 0,008 |
| LC/EC 15,00 | 0,064 | 0,025 | 0,013 |
| LC/EC 50,00 | 12,865 | 0,418 | 0,108 |
| LC/EC 85,00 | 2586,569 | 7,025 | 0,886 |
| LC/EC 90,00 | 9071,160 | 13,691 | 1,457 |
| LC/EC 95,00 | 58219,570 | 36,800 | 3,044 |
| LC/EC 99,00 | 1902959,000 | 235,086 | 12,118 |

χ^2 calculado (24 h)= 9,409; χ^2 calculado (48 h)= 17,553; χ^2 calculado (72 h)= 31,860; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza para t=48 h. Los resultados hay que interpretarlos con precaución (Notación del programa Probit)

La gráfica muestra estos valores medios con sus intervalos de confianza.

**Figura C III.52. Valores de EC(p) calculados mediante el método Probit**

A las 24 horas de exposición se obtienen valores de LC₅₀ e intervalos de confianza muy superiores a las concentraciones experimentales y por tanto, estos resultados hay que interpretarlos con precaución.

Para las 48 y 72 horas se obtienen valores de IC₅₀ de 0,418 y 0,108 mg/L respectivamente.

No se han encontrado referencias bibliográficas referentes a *Artemia*. Respecto a otros organismos, los resultados bibliográficos consultados presentan un rango de concentraciones entre 0,006 a 3,2 mg/L por tanto, los resultados presentados en este estudio son completamente comparables con otros resultados bibliográficos.

4.1.6.3. ENSAYOS CON BACTERIAS MARINAS. *VIBRIO FISCHERI*

Las concentraciones de ensayo utilizadas para la realización de esta prueba fueron las siguientes:

| Especie | Concentración de CADMIO (mg/L) | | | | | | | | | |
|------------------------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|------|
| <i>Vibrio fischeri</i> | 0,000 | 0,195 | 0,391 | 0,781 | 1,563 | 3,125 | 6,25 | 12,5 | 25,0 | 50,0 |

Para esta prueba, el control de calidad del ensayo mostró una inhibición de la luminiscencia al cabo de los 30 minutos de exposición del 40,74% respecto al control de CINA al 2%.

La siguiente gráfica muestra la representación gráfica de los diversos porcentajes de inhibición obtenidos para cada concentración.

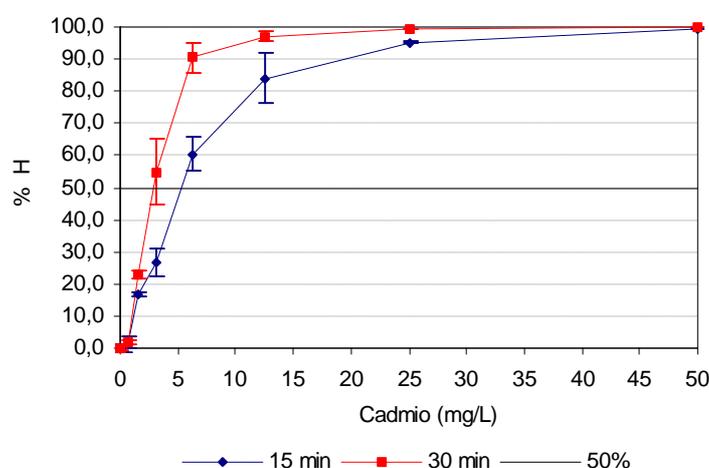


Figura C III.41. Variación de la inhibición del crecimiento con la concentración en el ensayo de toxicidad del CADMIO y *Vibrio fischeri*

Para calcular el valor de las EC(p) se linealizó la curva de inhibición de la bioluminiscencia convirtiendo los valores de porcentaje de inhibición en valores γ (EC₅₀ para $\gamma=1$, EC₂₅ para $\gamma=0,5$, y EC₅ para $\gamma=0,1$).

Los resultados de EC₅₀ obtenidos mediante el método de interpolación gráfica fueron los siguientes:

Tabla C III.55. EC(p) obtenidos mediante el método de interpolación gráfica en el ensayo de toxicidad del cadmio y *Vibrio fischeri*

| | $t=15 \text{ min}$ | $t=30 \text{ min}$ |
|------------------|--------------------|--------------------|
| EC ₅ | 1,126 | 1,004 |
| EC ₂₅ | 3,482 | 1,888 |
| EC ₅₀ | 4,809 | 2,683 |

Para este compuesto, no se han documentado referencias bibliográficas que permitan comparar las concentraciones obtenidas por otros autores en el ensayo de inhibición de la luminiscencia. En relación con otros organismos, los resultados son un orden de magnitud superior a los obtenidos para otros organismos, en concreto para crustáceos (Tabla A VII.1.).

4.1.6.4. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL ENSAYO DEL CADMIO

A partir de los resultados obtenidos con los tres taxones de ensayo se obtienen las siguientes conclusiones generales:

Resultados con microalgas:

- i) Los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad con cinco microalgas y cadmio demuestran que el diseño experimental y las medidas de biomasa obtenidas en función de la turbidez de la muestra, permiten obtener un conjunto de resultados de toxicidad coherentes, si bien, los niveles umbrales de toxicidad están muy condicionados por el diseño experimental, de tal forma que sólo es posible determinar los niveles NOEC en una de las algas de ensayo. Este valor es de 0,78 mg/L de Cd (II) .
- ii) Los diferentes resultados obtenidos en cada nivel de efecto (umbral, inhibición parcial del crecimiento y niveles algucidas) permiten afirmar que la toxicidad del cadmio depende de la especie de ensayo y del tiempo de exposición.
- iii) Los valores de IC₅₀ obtenidos para las diferentes especies varían entre 0,08 y 15,23 mg/L a las 72 horas, y entre 0,07 y 10,97 mg/L a las 96 horas de exposición.
- iv) En función de la IC₅₀ se obtiene la siguiente escala de sensibilidad al tóxico:

| | |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| ← + sensible al cadmio (II) | + resistente al cadmio (II) → |
| <i>C. gracilis</i> | <i>N. gaditana</i> |
| <i>T. chuii</i> | <i>I. galbana</i> |
| | <i>D. salina</i> |

- v) Respecto al nivel algucida, se han podido determinar estos niveles para todas las especies ensayadas. La concentración algucida más crítica ha sido 1,56 mg/L.

Resultados con *Artemia*:

- vi) Los resultados obtenidos tanto en el control como en las concentraciones de ensayo permiten afirmar que el diseño experimental ha sido correcto obteniéndose resultados coherentes y dentro de los rangos bibliográficos, si bien, y al objeto de poder ampliar los resultados al periodo de 24 horas, sería conveniente ampliar el rango de ensayo hacia concentraciones más altas.
- vii) La concentración de no-efecto mas pequeña observada ha sido 1 mg/L. La LC₅₀ obtenida a las 72 horas es de 3,88 mg/L.

Resultados con *Vibrio fischeri*:

- viii) En este ensayo se obtuvieron valores excesivamente elevados.

Resultados comparativos:

- ix) Comparando los resultados obtenidos en los diferentes niveles de efectos para los tres taxones, se obtiene que *Artemia* es el organismo que presenta mayor toxicidad a nivel umbral. En relación con la LC₅₀, *C. gracilis* y *Artemia* fueron las mas sensibles y *D. salina* la especie más resistente.

4.1.7. TOXICIDAD DEL ZINC (II)

Para la realización del ensayo con zinc, se realizó una variación en el medio nutriente utilizado consistente en la supresión del compuesto AEDT-Na₂. También se eliminó el suplemento de este elemento como metal esencial, al objeto de no variar las concentraciones de ensayo.

En los apartados siguientes, se resumen y comentan los resultados más relevantes obtenidos en los ensayo de toxicidad con zinc. En el Anexo VIII del presente documento, se encuentran detallados las condiciones de ensayo, mediciones de biomasa, cálculos realizados, así como otro tipo de información complementaria (propiedades físicas y químicas del compuesto y referencias ecotoxicológicas obtenidas por diversos autores).

4.1.7.1. ENSAYOS CON MICROALGAS MARINAS

Para este compuesto, el último de los compuestos específicos ensayados, se mantuvo los rangos y concentraciones seleccionadas para los metales cobre y cadmio. Estas concentraciones son las siguientes:

| <u>Especies</u> | <u>Concentración de zinc (mg/L)</u> | | | | | | | | | | |
|--------------------|-------------------------------------|------|------|------|------|------|------|-------|-------|-------|--------|
| Microalgas marinas | 0,0 | 0,20 | 0,39 | 0,78 | 1,56 | 3,13 | 6,25 | 12,50 | 25,00 | 50,00 | 100,00 |

En la figura C III.52. se muestra la evolución temporal de la concentración de biomasa normalizada de los ensayos de toxicidad del zinc y las microalgas marinas.

Las curvas de crecimiento obtenidas en estos ensayos muestran la respuesta de las algas frente a diferentes concentraciones de zinc. Para todas las algas ensayadas excepto para *T. chunii*, se observa una gran variabilidad en las respuestas de las poblaciones al tóxico. El alga *T. chunii* presenta una mayor resistencia al tóxico mostrando curvas de crecimiento de pendiente similar al control incluso para las concentraciones más altas.

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo

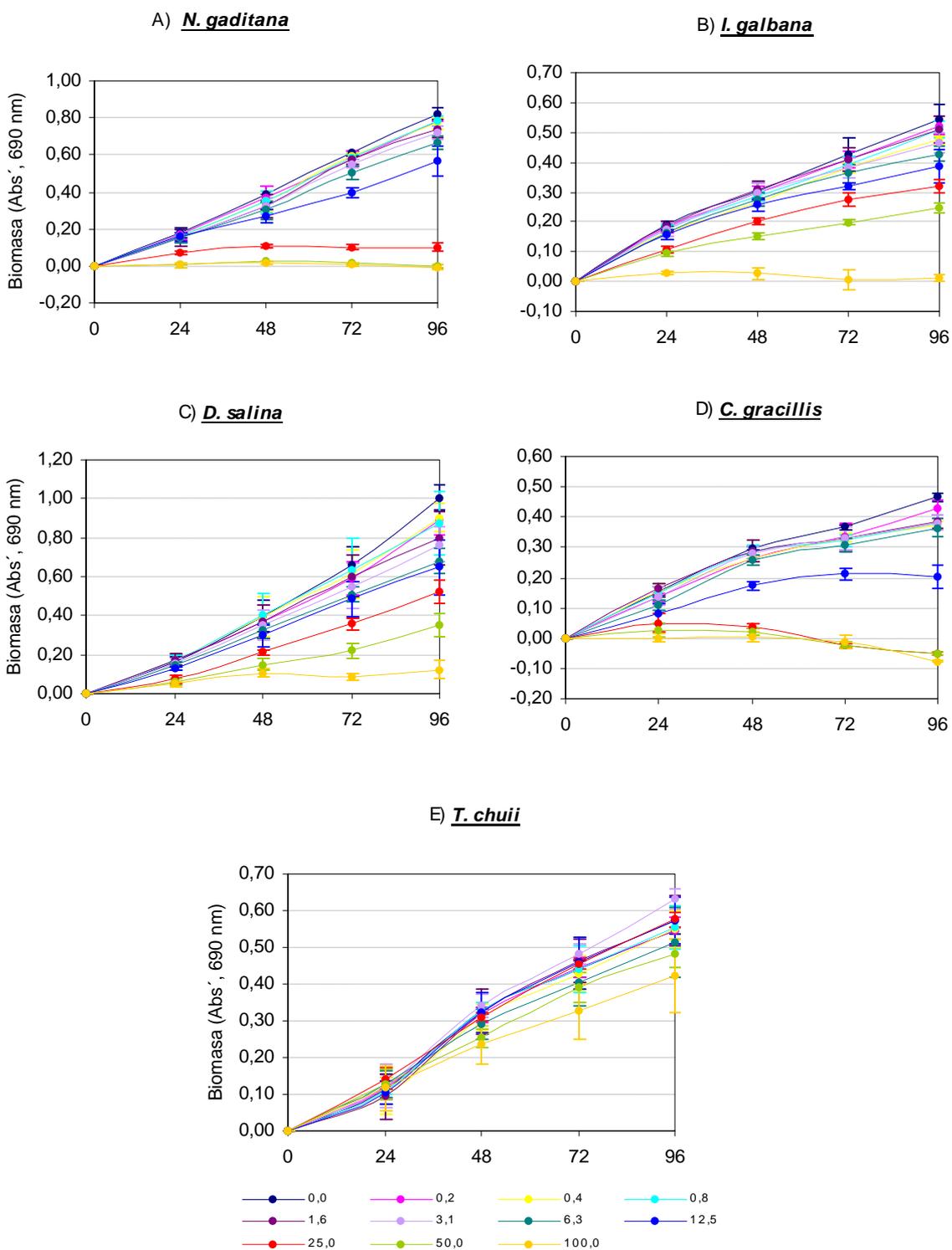


Figura C III.53. Evolución de la concentración de biomasa normalizada en el ensayo de toxicidad del ZINC y microalgas marinas

En la figura C III.54. se muestra la variación de la concentración de biomasa normalizada en el rango de concentraciones de ensayo para cada periodo de exposición. Con objeto de visualizar mejor los resultados y puesto que las concentraciones de ensayo están seleccionadas en un amplio rango de concentraciones (0,01 a 50 mg/L), el eje-x se ha construido en escala logarítmica.

Observando las curvas correspondientes a las 72 y 96 horas de exposición se identifica claramente la forma sigmoideal característica de este tipo de representación. Hay que destacar que todas las algas presentan una zona superior muy extensa, esto es, gran número de concentraciones de ensayo presentan comportamientos similares a la población control. Esto indica a priori una gran resistencia de las microalgas al tóxico en el rango de concentraciones de ensayo

Otro aspecto a destacar de estos ensayos es la alta variabilidad de los replicados de cada concentración como así lo muestran las barras de error. Este hecho puede influir en la exactitud de los cálculos de las diferentes concentraciones de efecto.

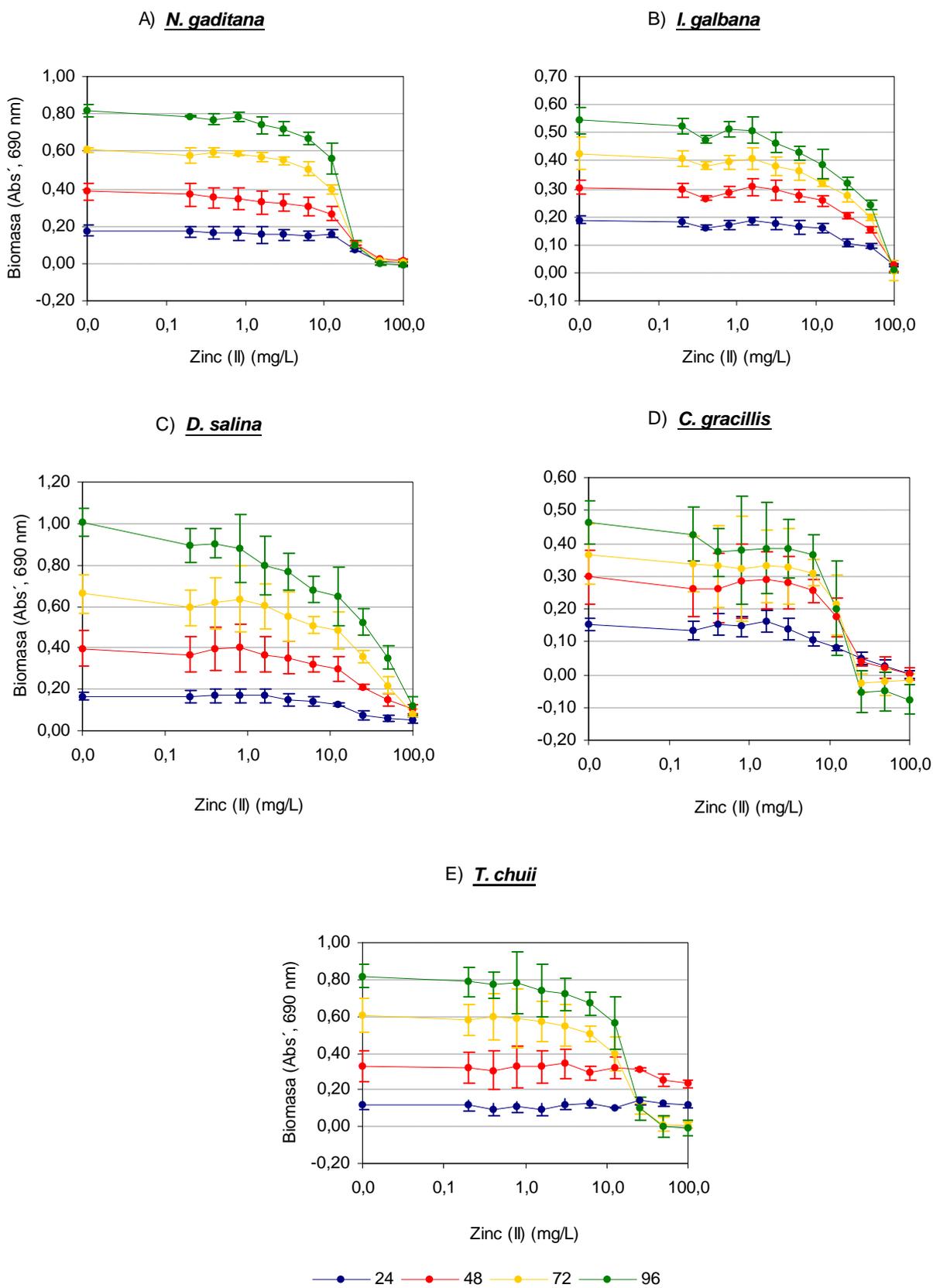


Figura C III.54. Variación de la concentración de biomasa normalizada con la concentración de ZINC

OBTENCIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES

Se ensayó la normalidad de la distribución de resultados de crecimiento mediante el test de Shapiro-Wilk y la homogeneidad de la varianza mediante el test de Barlett. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla C III.56. W calculados del ensayo de ZINC y microalgas marinas. Test de Shapiro Wilk

| Periodo de exposición | Test de Shapiro Wilk. W calculados | | | | | W crítico para N=33 y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracillis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 24 h | 0,967 | 0,966 | 0,952 | 0,942 | 0,947 | 0,931 |
| 48 h | 0,938 | 0,975 | 0,937 | 0,982 | 0,985 | |
| 72 h | 0,946 | 0,974 | 0,948 | 0,973 | 0,963 | |
| 96 h | 0,966 | 0,978 | 0,961 | 0,971 | 0,964 | |
| | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | Normalidad para todos los t | |

Como puede observarse en la tabla, todos los ensayos y en todos los periodos de exposición se cumplió la condición de normalidad de la distribución de resultados.

Tabla C III.57. B calculados del ensayo de ZINC y microalgas marinas. Test de Barlett

| Periodo de exposición | Test de Barlett. B calculados | | | | | B crítico para 10 grados de libertad y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|-------------------------------|-------------------|------------------|---------------------|-----------------|--|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracillis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 24 h | 11,22 | 5,64 | 5,92 | 2,79 | 6,87 | 18,31 |
| 48 h | 16,31 | 6,24 | 12,17 | 10,19 | 9,73 | |
| 72 h | 9,68 | 8,04 | 11,69 | 11,15 | 7,86 | |
| 96 h | 15,12 | 7,22 | 6,31 | 13,66 | 11,71 | |
| | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | Homogeneidad | |

Los resultados indican en todos los casos homogeneidad de la varianza.

Los resultados obtenidos de la aplicación del test de Dunnett fueron los siguientes:

Tabla C III.58. t calculados del ensayo de ZINC y microalgas marinas (t=72 h). Método de Dunnett

| mg/L ZINC | Test de Dunnett. Valores de t-calculados | | | | | T crítica para 22 grados de libertad y 10 concentraciones |
|-----------|--|-------------------|------------------|---------------------|-----------------|---|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracillis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 0,20 | 1,48 | 0,74 | 0,90 | 1,53 | -0,08 | 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 0,39 | 0,70 | 1,80 | 0,61 | 1,77 | 0,32 | |
| 0,78 | 1,02 | 1,27 | 0,35 | 2,11 | 0,00 | |
| 1,56 | 1,86 | 0,70 | 0,79 | 1,78 | -0,49 | |
| 3,13 | 2,95 (*) | 1,84 | 1,45 | 1,80 | -1,00 | |
| 6,25 | 5,23 | 2,60 | 2,01 | 2,75 (*) | 0,92 | |
| 12,5 | 10,84 | 4,38 (*) | 2,33 | 7,46 | -0,40 | |
| 25,0 | 25,95 | 6,15 | 4,02 (*) | 18,87 | -0,26 | |
| 50,0 | 30,43 | 9,29 | 5,84 | 18,74 | 1,24 | |
| 100,0 | 30,74 | 17,00 | 7,61 | 18,39 | 2,79 (*) | |

Tabla C III.59. t calculados del ensayo de ZINC y microalgas marinas (t=96 h). Método de Dunnett

| mg/L ZINC | Test de Dunnet. Valores de t -calculados | | | | | T crítica para 22 grados de libertad y 10 concentraciones |
|-----------|--|-------------------|------------------|---------------------|-----------------|---|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracillis</i> | <i>T. chuii</i> | |
| 0,20 | 1,04 | 0,77 | 1,42 | 2,10 | -0,05 | 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 0,39 | 1,59 | 2,57 | 1,28 | 5,05 (*) | -0,11 | |
| 0,78 | 1,21 | 1,19 | 1,62 | 4,60 | -0,22 | |
| 1,56 | 2,57 | 1,28 | 2,61 | 4,31 | -0,60 | |
| 3,13 | 3,22 (*) | 2,94 (*) | 3,01 (*) | 4,51 | -1,82 | |
| 6,25 | 4,94 | 4,31 | 4,08 | 5,52 | 0,62 | |
| 12,5 | 8,45 | 5,84 | 4,48 | 14,30 | -0,58 | |
| 25,0 | 23,75 | 8,28 | 6,05 | 28,07 | -0,65 | |
| 50,0 | 27,15 | 11,15 | 8,18 | 28,00 | 1,28 | |
| 100,0 | 27,30 | 19,79 | 11,10 | 29,37 | 2,51 | |

La siguiente tabla muestra un resumen de los resultados umbrales obtenidos:

Tabla C III.60. Valores NOEC y LOEC obtenidos en el ensayos del ZINC y las microalgas marinas

| | Microalgas Marinas | | | | |
|-------------|--------------------|-------------------|------------------|---------------------|-----------------|
| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracillis</i> | <i>T. chuii</i> |
| 72 h | | | | | |
| NOEC | 1,56 | 6,25 | 12,5 | 3,13 | 50,0 |
| LOEC | 3,13 | 12,50 | 25,0 | 6,25 | 100,0 |
| 96 h | | | | | |
| NOEC | 1,56 | 1,56 | 1,56 | 0,20 | --- |
| LOEC | 3,13 | 3,13 | 3,13 | 0,39 | --- |

Los resultados indican que en relación con los efectos umbrales, el alga más sensible a las 72 y 96 horas de exposición es *N. gaditana* determinándose mediante el test de Dunnett una LOEC de 3,13 mg/L y por tanto una NOEC de 1,56 mg/L para los periodos de exposición de 72 y 96 horas.

T. chuii es el alga más resistente mostrando una LOEC de 100 mg/L y por tanto la NOEC de 50 mg/L en el periodo de exposición de 72 horas. A las 96 horas, ninguna de las concentraciones ensayadas muestra diferencia estadísticamente significativa respecto a la población control

DETERMINACIÓN DE LOS IC_p

Los resultados de los valores medios de los IC_p calculados para cada una de las algas se muestra en la tabla siguiente.

Tabla C III.61. *ICp* calculados en el ensayo de ZINC y microalgas marinas

| t (h) | Expresión de toxicidad | Valores de <i>ICp</i> | | | | | | | | | | | | | | |
|-------|------------------------|-----------------------|-------|-------|-------------------|-------|-------|------------------|-------|-------|--------------------|-------|-------|-----------------|-------|-------|
| | | <i>N. gaditana</i> | | | <i>I. galbana</i> | | | <i>D. salina</i> | | | <i>C. gracilis</i> | | | <i>T. chuii</i> | | |
| | | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES | ICEI | Media | ICES |
| 72 | IC ₅ | -1,07 | 1,22 | 3,68 | -0,13 | 1,13 | 11,73 | -0,03 | 0,80 | 7,43 | 0,30 | 0,17 | 0,59 | -24,25 | 22,62 | 59,84 |
| | IC ₂₅ | 4,80 | 9,02 | 11,64 | -3,83 | 12,80 | 30,65 | -7,29 | 8,68 | 24,86 | 6,21 | 8,40 | 10,31 | (**) | 81,41 | (**) |
| | IC ₅₀ | 14,59 | 16,39 | 17,90 | 25,56 | 44,50 | 57,23 | 15,42 | 29,24 | 44,54 | 12,52 | 14,16 | 15,96 | | | |
| | IC ₇₅ | 21,67 | 22,83 | 23,84 | 65,34 | 74,25 | 85,15 | 39,09 | 68,47 | 87,52 | 18,76 | 19,58 | 20,48 | | | |
| | IC ₉₅ | 41,50 | 45,19 | 49,18 | | (*) | | | | | 23,76 | 23,92 | 24,10 | | | |
| 96 | IC ₅ | -1,47 | 0,70 | 3,92 | -0,10 | 0,57 | 4,65 | 0,02 | 0,18 | 1,87 | 0,00 | 0,13 | 0,37 | -23,61 | 25,27 | 47,10 |
| | IC ₂₅ | 4,12 | 9,74 | 16,94 | -2,50 | 9,65 | 24,36 | -2,30 | 3,37 | 9,14 | 3,43 | 6,68 | 8,60 | | (*) | |
| | IC ₅₀ | 13,69 | 16,61 | 19,21 | 23,25 | 41,02 | 56,84 | 11,44 | 27,86 | 43,82 | 9,45 | 11,36 | 14,86 | | | |
| | IC ₇₅ | 20,74 | 22,17 | 23,51 | 66,29 | 73,28 | 79,21 | 50,52 | 71,67 | 87,65 | 15,52 | 17,73 | 20,33 | | | |
| | IC ₉₅ | 33,37 | 36,74 | 43,98 | (**) | 96,82 | (**) | | | | 23,10 | 23,56 | 24,07 | | | |

Método *bootstrap*. Valores medios; ICEI: Intervalo de confianza expandido inferior; ICEI: Intervalo de confianza expandido superior

(*) No es posible calcular la interpolación lineal

(**) No es posible calcular los intervalos de confianza

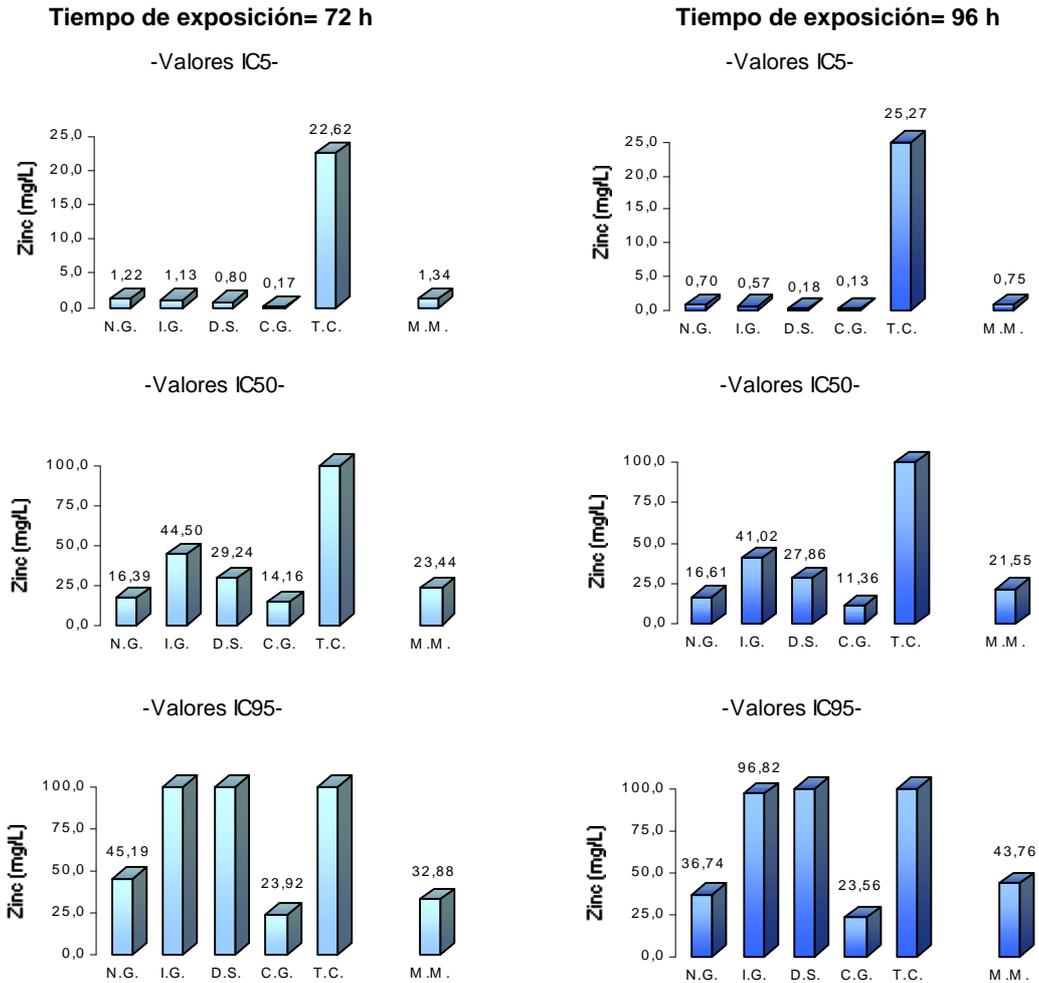
En las gráficas mostradas en la Figura C III.54. se representan los valores de IC₅, IC₅₀ e IC₉₅ a las 72 y 96 h de exposición obtenidos en los ensayos de zinc y las cinco especies de microalgas de ensayo. La última columna de cada gráfico representa la media geométrica de los valores de *ICp* obtenidos para cada microalga. En la Figura C III.55. se representa una clasificación de las algas en función de la sensibilidad a este tóxico.

La tendencia general que siguen todas las algas es un aumento en la sensibilidad al tóxico a medida que transcurre el ensayo. Esto se muestra en una disminución de los diferentes *ICp* determinados para cada alga. Esta regla no se cumple con *T. chuii* la cual muestra un comportamiento diferente al resto de microalgas y una gran resistencia al tóxico. Esta resistencia se muestra en el hecho de que los resultados de crecimiento de los diferentes tratamientos, no permiten calcular concentraciones de efecto superiores al 25%, esto es, IC₂₅.

De nuevo hay que resaltar los resultados obtenidos por *T. chuii* los cuales llegan a ser de dos órdenes de magnitud superiores al resto de las algas.

Respecto a la clasificación realizada en función de la sensibilidad/resistencia al tóxico, en los periodos de 72 y 96 horas se observa que el alga más sensibles es *C. gracilis* mientras que el alga más resistente es *T. chuii*.

Ensayo de toxicidad del ZINC



N.G.: *N. gaditana*; I.G.: *I. galbana*; D.S.: *D. salina*; C.G.: *C. gracilis*; T.C.: *T. chuii*; M.M.: Microalgas Marinas (valores correspondiente a la media geométrica de los valores obtenidos para las cinco algas de ensayo)

Figura C III.54. Resultados de IC₅, IC₅₀ e IC₉₅ del ensayo de toxicidad del ZINC con 5 microalgas marinas para periodos de exposición de 72 y 96 horas

| | | <u>IC5</u> | <u>IC50</u> | <u>IC95</u> |
|------|----------------|-------------|-------------|-------------|
| 72 h | + sensibilidad | C. gracilis | C. gracilis | C. gracilis |
| | ↑ | D. salina | N. gaditana | N. gaditana |
| | ↓ | I. galbana | D. salina | |
| | - sensibilidad | N. gaditana | I. galbana | |
| | | T. chuii | T. chuii | |
| | | <u>IC5</u> | <u>IC50</u> | <u>IC95</u> |
| 96 h | + sensibilidad | C. gracilis | C. gracilis | C. gracilis |
| | ↑ | D. salina | N. gaditana | N. gaditana |
| | ↓ | I. galbana | D. salina | I. galbana |
| | - sensibilidad | N. gaditana | I. galbana | |
| | | T. chuii | T. chuii | |

Figura C III.55. Sensibilidad de las especies de microalgas frente a zinc

En relación con otros resultados de toxicidad obtenidos de la bibliografía, Moreno Garrido (1997) determina valores de IC_{50} a las 72 h de 3,9 mg/L para el alga *N. gaditana*. Respecto a otras citas bibliográficas relativas a la toxicidad del zinc en microalgas, los rangos de concentración oscilan entre 0,2 y 9,8 mg/L Zn (Anexo VIII).

En el presente estudio, la concentración IC_{50} para *N. gaditana* ha sido de 16,39 mg/L Zn (II) y para las otras algas entre 14,16 y 44,50. Estos resultados son muy superiores a los documentados. Si bien el estudio estadístico realizado es correcto y en los rangos de concentraciones de ensayo se obtienen una amplia gama de respuestas, sería conveniente realizar nuevos estudios con este compuesto al objeto de comprobar los resultados obtenidos en el presente estudio.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Los resultados obtenidos para las cinco microalgas son los siguientes:

| | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>D. salina</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>T. chuii</i> |
|----------------------------|--------------------|-------------------|------------------|--------------------|-----------------|
| Concentración alguistática | 25 mg/L | 100 mg/L | 100 mg/L | 25 mg/L | 100 mg/L |
| Concentración alguicida | 50 mg/L | > 100 mg/L | > 100 mg/L | 50 mg/L | > 100 mg/L |

En las experiencias realizadas con *I. galbana*, *D. salina* y *T. chuii* se observó un aumento en la biomasa de todos los cultivos realizados para la obtención de estas respuestas; por tanto, se define la concentración alguistática a la mayor concentración ensayada. Para estas algas no ha sido posible determinar experimentalmente la concentración de ensayo.

Para *N. gaditana* y *C. gracilis*, la concentración de 50 mg/L no mostró aumento significativo de la biomasa por tanto, esta concentración define el nivel alguicida.

CONSIDERACIONES ADICIONALES SOBRE LOS VALORES NOEC, IC_P Y ALGUICIDAS

Para el nivel de efecto umbral existen algunos resultados los cuales hay que interpretarlos con precaución. Estos son los siguientes:

- ⊗ Valores de IC_5 de *N. gaditana* a las 72 y 96 h.
- ⊗ Valores de IC_5 de *I. galbana* a las 72 y 96 h.
- ⊗ Valores de IC_5 de *D. salina* a las 72 y 96 h.
- ⊗ Valores de IC_{25} de *D. salina* a las 72 h.
- ⊗ Valores de IC_5 de *C. gracilis* a las 72 y 96 h.
- ⊗ Valores de IC_5 de *T. chuii* a las 72 y 96 h.

Para el nivel de efecto alguicida no hay que realizar ninguna consideración en este apartado.

4.1.7.2. ENSAYOS CON CRUSTÁCEOS. ARTEMIA SALINA

En este apartado se muestran los resultados de toxicidad obtenidos para *Artemia* expuesta a diversas concentraciones de zinc.

| <u>Especie</u> | <u>Concentración de ZINC (mg/L)</u> | | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|------|-------|
| <i>Artemia salina</i> | 0,0 | 0,5 | 1,0 | 2,5 | 5,0 | 7,5 | 10,0 | 25,0 | 50,0 | 75,0 | 100,0 |

La siguiente gráfica muestra una representación de los porcentajes de supervivientes obtenidos en cada periodo de ensayo.

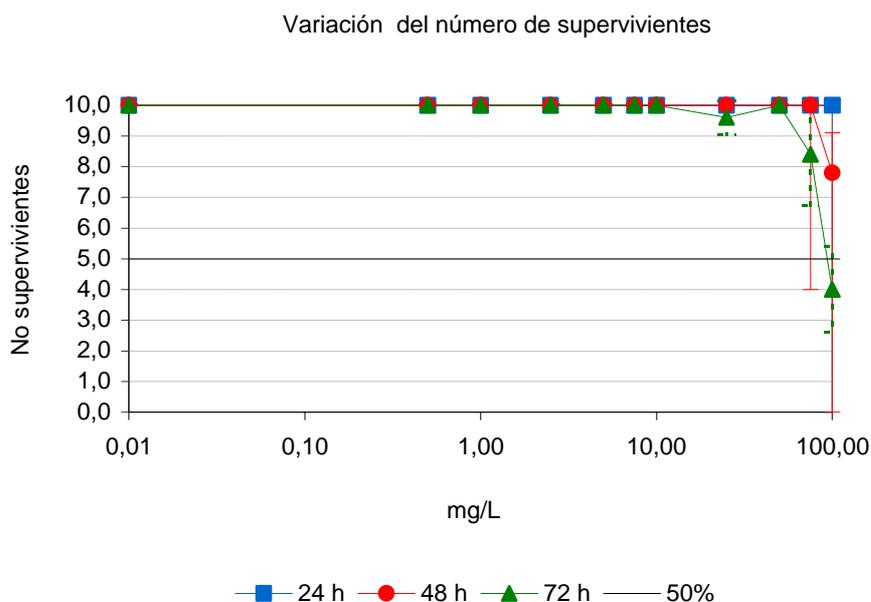


Figura C III.56. variación del número de supervivientes del ensayo de toxicidad del ZINC y *Artemia*

DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES

Gráficamente, para el ensayo de toxicidad aguda de *Artemia* y el zinc se establece la concentración de efectos mínimos observados en 100, 75 y 25 mg/L a las 24, 48 y 72 horas de exposición. Las concentraciones de no efecto son por tanto, 75, 50 y 10 mg/L de Zn.

DETERMINACIÓN DE LOS EC(P)

Método de interpolación gráfica

Mediante el método de interpolación gráfica, se han determinado los valores de LC₅₀ para cada periodo de exposición. Los resultados fueron los siguientes:

| <u>Zinc (mg/L)</u> | <u>24 h</u> | <u>48 h</u> | <u>72 h</u> |
|------------------------|-------------|-------------|-------------|
| LC₅₀ | --- | --- | 94,3 |

Para este compuesto, sólo es posible calcular la LC₅₀ a las 72 horas de exposición.

Método Probit

La siguiente tabla muestra los valores medios para diversos LC(p) obtenidos mediante el método Probit.

Tabla CIII.61. Resultados de diferentes LC(p) obtenidos mediante el método Probit

| 72 h | |
|-------------|---------|
| LC/EC 1,00 | 31,309 |
| LC/EC 5,00 | 44,563 |
| LC/EC 10,00 | 53,791 |
| LC/EC 15,00 | 61,076 |
| LC/EC 50,00 | 104,480 |
| LC/EC 85,00 | 178,731 |
| LC/EC 90,00 | 202,938 |
| LC/EC 95,00 | 244,961 |
| LC/EC 99,00 | 348,655 |

χ^2 calculado (72 h)= 34,388; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza para t=48 h. Los resultados hay que interpretarlos con precaución (Notación del programa Probit)

Como muestra la tabla de resultados, sólo ha sido posible realizar los cálculos para el periodo de exposición de 72 horas.

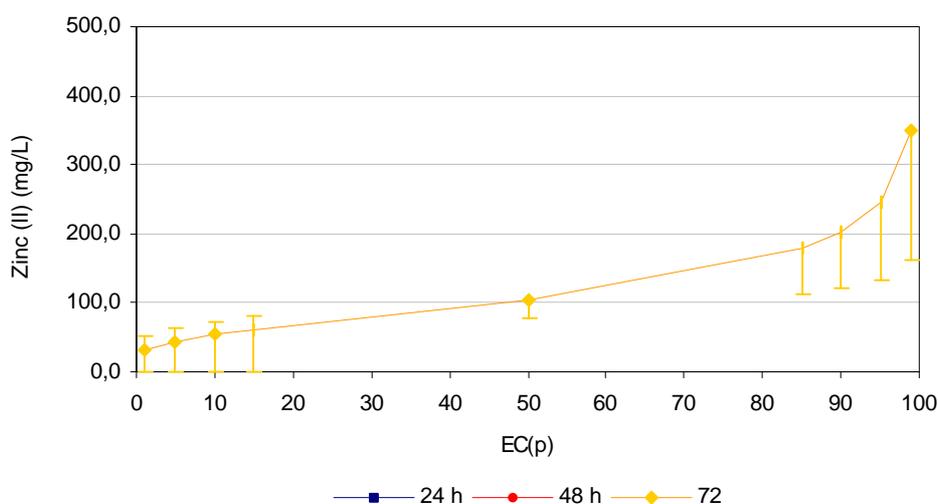


Figura C III.57. Valores de EC(p) calculados mediante el método Probit

La gráfica muestra los diferentes Ecp obtenidos mediante el método Probit. Hay que resaltar los amplios intervalos de confianza obtenidos para porcentajes de respuesta iguales o superiores a 50.

Respecto a referencias ecotoxicológicas de este compuesto con organismos acuáticos, en el Anexo VIII se resumen gran número de resultados. Sin duda, la referencias más significativa es las que muestra resultados toxicológicos con *Artemia salina* (Rammamorthy, 1995) mostrando un valor de LC₅₀ a las 24 horas de exposición de 63,2 mg/L. En este trabajo se obtiene una LC₅₀ a las 72 h de 104,48 y un limite de confianza inferior de 78,45 mg/L (Anexo VIII, Tabla A VII.24), por tanto, los resultados obtenidos son comparables con los consultados en la bibliografía.

4.1.7.3. RESUMEN Y CONCLUSIONES DEL ENSAYO DEL ZINC

A partir de los resultados obtenidos con los tres taxones de ensayo se obtienen las siguientes conclusiones generales:

Resultados con microalgas:

- i) Los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad con cinco microalgas y zinc demuestran que el diseño experimental y las medidas de biomasa obtenidas en función de la turbidez de la muestra, permiten obtener un conjunto de resultados de toxicidad coherentes.
- ii) Los diferentes resultados obtenidos en cada nivel de efecto (umbral, inhibición parcial del crecimiento y niveles alguicidas) permiten afirmar que la toxicidad del zinc depende de la especie de ensayo y del tiempo de exposición.
- iii) El rango de concentraciones ensayado ha permitido calcular los niveles umbrales de toxicidad. La menor NOEC obtenida ha sido de 1,56 mg/L.
- iv) Los valores de IC₅₀ obtenidos para las diferentes especies varían entre 14,16 y 44,50 mg/L a las 72 horas, y entre 11,36 y 41,02 a las 96 horas de exposición. Para el alga *T. chuii* estos valores son superiores al rango de concentraciones ensayado.
- v) En función de la IC₅₀ se obtiene la siguiente escala de sensibilidad al tóxico:

| | |
|----------------------------------|------------------------------------|
| ← + sensible al zinc (II) | + resistente al zinc (II) → |
| <i>C. gracilis</i> | <i>N. gaditana</i> |
| <i>D. salina</i> | <i>I. galbana</i> |
| | <i>T. chuii</i> |

- vi) Respecto al nivel alguicida, se han podido determinar estos niveles para dos de las especies ensayadas estableciendo un nivel de 50 mg/L.

Resultados con *Artemia*:

- vii) Los resultados obtenidos tanto en el control como en las concentraciones de ensayo muestran la gran resistencia de este organismo al zinc. El rango de ensayo seleccionado es inadecuado para la obtención de respuestas agudas.
- viii) La menor concentración de efectos no observados se ha determinado en 10 mg/L.
- ix) Sólo se ha podido determinar la LC₅₀ a las 72 horas de exposición determinándose una concentración de 94,3 mg/L.
- x) La concentración de no-efecto mas pequeña observada ha sido 1 mg/L. Las LC₅₀ obtenida a las 72 horas es de 3,88 mg/L.

Resultados comparativos:

- xi) Comparando los resultados obtenidos en los diferentes niveles de efectos para los dos taxones ensayados, se obtiene que en general las algas son más sensibles al zinc que el crustáceo *Artemia*.

4.1.8. CLASIFICACIÓN DE LOS ENSAYOS DE TOXICIDAD

A lo largo de los comentarios realizados en los diferentes estudios de toxicidad se ha visto que existe una gran variabilidad en los resultados de toxicidad en función de la especie de ensayo, y con respecto al periodo de exposición. En orden a realizar una clasificación de forma general de los compuestos de ensayo en función de su toxicidad y de los organismos en función de su sensibilidad, del conjunto de resultados se han seleccionado dos niveles de toxicidad y un periodo de exposición:

| | | |
|-----------------|------------------|--------|
| Microalgas | NOEC | 72 h |
| | IC ₅₀ | 72 h |
| Artemia | LC ₅ | 72 h |
| | LC ₅₀ | 72 h |
| Vibrio fischeri | EC ₅ | 30 min |
| | EC ₃₀ | 30 min |

Los resultados para las microalgas son los siguientes:

Nannochloropsis gaditana

| Compuesto | NOEC (mg/L) | | Compuesto | IC ₅₀ (mg/L) |
|-----------|-------------|------------------|-----------|-------------------------|
| Cadmio | 0,20 | ↑ + toxico | Cadmio | 0,16 |
| Cobre | 0,39 | | Cobre | 1,03 |
| LAS | 1,00 | toxico - ↓ | NP9EO | 3,74 |
| Zinc | 1,56 | | LAS | 4,60 |
| NP9EO | 2,00 | | Lindano | 14,80 |
| Lindano | 5,00 | | Zinc | 16,39 |
| Fenol | 50,00 | | Fenol | 114,65 |

Isochrysis galbana

| Compuesto | NOEC (mg/L) | | Compuesto | IC ₅₀ (mg/L) |
|-----------|-------------|------------------|-----------|-------------------------|
| Lindano | 0,01 | ↑ + toxico | Cobre | 1,04 |
| Cadmio | 0,20 | | Cadmio | 1,44 |
| Cobre | 0,39 | toxico - ↓ | NP9EO | 3,28 |
| LAS | 1,00 | | LAS | 7,94 |
| NP9EO | 1,00 | | Lindano | 9,60 |
| Zinc | 6,25 | | Zinc | 44,50 |
| Fenol | 50,00 | | Fenol | 187,70 |

Dunaliella salina

| Compuesto | NOEC (mg/L) | | Compuesto | IC ₅₀ (mg/L) |
|-----------|-------------|------------------|-----------|-------------------------|
| Cobre | 0,39 | ↑ + toxico | Cobre | 3,60 |
| Cadmio | 0,78 | | LAS | 5,94 |
| LAS | 1,00 | toxico - ↓ | Lindano | 8,30 |
| Lindano | 2,50 | | NP9EO | 12,29 |
| NP9EO | 12,00 | | Cadmio | 15,23 |
| Zinc | 12,50 | | Zinc | 29,24 |
| Fenol | 50,00 | | Fenol | 164,30 |

Chaetoceros gracilis

| Compuesto | NOEC (mg/L) | | Compuesto | IC ₅₀ (mg/L) |
|-----------|-------------|--------|-----------|-------------------------|
| Cadmio | 0,20 | ↑ + | Cadmio | 0,15 |
| Cobre | 0,39 | | Cobre | 1,07 |
| LAS | 1,00 | toxico | NP9EO | 2,04 |
| NP9EO | 1,00 | | LAS | 2,42 |
| Zinc | 3,10 | toxico | Lindano | 15,10 |
| Lindano | 5,000 | | Zinc | 14,16 |
| Fenol | 50,000 | ↓ | Fenol | 215,65 |

Tetraselmis chuii

| Compuesto | NOEC (mg/L) | | Compuesto | IC ₅₀ (mg/L) |
|-----------|-------------|--------|-----------|-------------------------|
| Cadmio | 0,20 | ↑ + | Cadmio | 0,19 |
| Cobre | 0,20 | | Lindano | 2,10 |
| LAS | 1,00 | toxico | Cobre | 2,55 |
| Lindano | 1,00 | | LAS | 6,10 |
| NP9EO | 4,00 | toxico | NP9EO | 13,30 |
| Fenol | 50,00 | | Zinc | 100,00 |
| Zinc | 50,00 | ↓ | Fenol | 215,10 |

Finalmente, se clasifican las microalgas en función de la "sensibilidad global" hacia los compuestos de ensayo, y los compuestos de ensayo respecto a su toxicidad de la siguiente forma:

| | ← Mayor sensibilidad | | | Menor sensibilidad → | | |
|------------------|----------------------|--------------------|--------------------|----------------------|------------------|--|
| NOEC | <i>I. galbana</i> | <i>C. gracilis</i> | <i>N. gaditana</i> | <i>T. chuii</i> | <i>D. salina</i> | |
| IC ₅₀ | <i>C. gracilis</i> | <i>N. gaditana</i> | <i>I. galbana</i> | <i>T. chuii</i> | <i>D. salina</i> | |

| | ← Mayor toxicidad | | | Menor toxicidad → | | | |
|------------------|-------------------|-------------|-----|-------------------|---------|-----------|-------|
| NOEC | Cadmio (II) | Cobre (II) | LAS | Lindano | NPO | Zinc (II) | Fenol |
| IC ₅₀ | Cobre (II) | Cadmio (II) | LAS | NP9EO | Lindano | Zinc (II) | Fenol |

Para el resto de organismos de ensayo, los resultados son los siguientes:

Artemia

| Compuesto | LC ₅ (mg/L) | | Compuesto | LC ₅₀ (mg/L) |
|-----------|------------------------|--------|-----------|-------------------------|
| Lindano | 0,000 | ↑ + | Lindano | 0,006 |
| Cadmio | 0,004 | | Cadmio | 0,108 |
| Cobre | 0,403 | toxico | Cobre | 4,575 |
| NP9EO | 2,105 | | LAS | 5,753 |
| LAS | 3,397 | toxico | NP9EO | 10,539 |
| Fenol | 7,236 (*) | | Fenol | 45,290 (*) |
| Zinc | 44,563 | ↓ | Zinc | 104,480 |

(*) 48 h

Vibrio fischeri

| Compuesto | LC ₅ (mg/L) | | Compuesto | LC ₅₀ (mg/L) |
|-----------|------------------------|--------|-----------|-------------------------|
| Cadmio | 1,004 | ↑ + | Cadmio | 2,683 |
| Lindano | 2,190 | | Lindano | 8,590 |
| Fenol | 2,770 | toxico | NP9EO | 19,100 |
| LAS | 15,850 | | Fenol | 27,710 |
| NP9EO | 19,100 | toxico | Cobre | 543,800 |
| Cobre | 395,000 | | LAS | 627,800 |
| Zinc | --- | ↓ | Zinc | --- |

4.1.9. ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL LAS E *ISOCHRYSIS GALBANA* EN AGUAS RECEPTORAS

En este apartado se resumen los resultados obtenidos en el estudio de toxicidad del compuesto LAS y el alga *Isochrysis galbana*, utilizando como matriz de ensayo, agua de mar sintética y diferentes aguas receptoras del litoral andaluz.

El objeto de este estudio es extrapolar los resultados de toxicidad de este compuesto al medio natural en las condiciones nutritivas de éste y comprobar si existe un aumento de la toxicidad de los compuestos en condiciones limitantes de nutrientes y qué magnitud tiene este aumento de la toxicidad en diferentes áreas litorales del Golfo de Cádiz.

Para la realización de estas experiencias sólo se ha utilizado una especie del conjunto de microalgas. La especie seleccionada ha sido *I. galbana* puesto que ha demostrado una mayor resistencia al tóxico y por tanto va ser en este alga en el que se pueda observar mejor variaciones en la toxicidad del compuesto ensayado.

Para no hacer demasiado extenso este apartado, la estructura que se ha seguido es la siguiente:

- Primeramente se procederá a describir la evolución de los dos ensayos de toxicidad (con y sin aporte de nutrientes) correspondientes a cada matriz de ensayo. Esta descripción se realizará bien individualmente para cada condición nutritiva, o bien mediante comparaciones entre ambas condiciones.
- Además se realizará un estudio comparativo del crecimiento de cada concentración de ensayo en las diferentes matrices.
- Seguidamente se realizará un estudio de normalidad y homogeneidad de la varianza y se determinarán los efectos umbrales obtenidos para cada ensayo. En el caso de que se encuentren diferencias significativas entre los resultados obtenidos para cada tipo de agua de dilución y/o para cada tipo de condición nutritiva, se procederá a comentar los resultados.
- Para los diferentes ensayos, se mostrarán los resultados obtenidos en el cálculo de las ICp. En el caso de que se encuentren diferencias significativas entre los resultados obtenidos para cada tipo de agua de dilución y/o para cada tipo de condición nutritiva, se procederá a comentar los resultados.
- Finalmente se presentarán las conclusiones obtenidas de la realización de estos ensayos.

4.1.9.1. RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS DIVERSOS ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL LAS EN AGUAS RECEPTORAS

Las concentraciones de ensayo que se utilizaron en todos los ensayos incluidos en este apartado fueron las siguientes:

| <u>Especies</u> | <u>Concentración de LAS (mg/L)</u> | | | | | |
|-------------------|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|------|
| <i>I. galbana</i> | 0,0 | 2,0 | 4,0 | 6,0 | 8,0 | 10,0 |

Los niveles de nutrientes medidos en el agua de dilución utilizada para los ensayos de toxicidad fueron los que se muestran a continuación:

| <i>Nutrientes</i> | <i>Ría de Huelva</i> | <i>Bahía de Cádiz</i> | <i>Río Iro</i> | <i>Bahía de Algeciras</i> |
|-------------------|----------------------|-----------------------|----------------|---------------------------|
| C (mg/L) | 27,45 | 31,17 | 44,03 | 30,21 |
| N (mg/L) | 0,172 | 0,109 | 2,402 | 0,302 |
| P (mg/L) | 0,057 | 0,013 | 0,463 | 0,004 |
| Si (mg/L) | 0,046 | 0,120 | 0,372 | 0,070 |

4.1.9.1.1. ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL LAS E *ISOCHRYSIS GALBANA*. AGUA DE MAR SINTÉTICA

En este apartado se resumen los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad del LAS e *I. galbana* utilizando como matriz salina para la fabricación de las disoluciones de ensayo, agua de mar sintética según la formulación propuesta por la USEPA (Weber, 1993). Este ensayo a su vez se ha dividido en dos:

- *Ensayo con adición de un medio nutritivo* (medio f/2), es decir, condiciones no limitantes de nutrientes.
- *Ensayo sin adición de medio nutriente*, es decir, el crecimiento que se produzca en la población será debido a cantidades residuales de nutrientes presentes en el mínimo volumen de agua que ha quedado en el proceso de formación del inóculo de ensayo (apartado 3.1.3.2.3.2); y en reservas nutritivas de las microalgas destinadas a funciones vitales de mantenimiento y reproducción (Kooijman, 2000).

En la figura C III.58. se muestran las gráficas de evolución temporal de la concentración de biomasa normalizada de los ensayo con y sin suplemento de medio nutriente.

Se puede observar, cómo la gráfica obtenida para el ensayo con aporte de nutrientes es similar a la descrita en el apartado 4.1.1.1 (ensayo de toxicidad del LAS en condiciones estándar), incluso presenta el mismo periodo de latencia durante las primeras 24 horas de ensayo para, posteriormente crecer de forma exponencial.

En la gráfica se puede observar el crecimiento del alga en las diferentes concentraciones de ensayo. La primera concentración de tóxico ensayada es de 2 mg/L. En la gráfica se puede observar que la curva de crecimiento para esta concentración no se diferencia significativamente de la curva de crecimiento del control. La siguiente concentración es de 4 mg/L la cual presenta una curva de crecimiento claramente diferenciada del control, por tanto esta concentración ejerce una inhibición en el crecimiento del alga. A partir de esta concentración, y cuanto mayor es ésta, más inhibida se encuentra el alga y por tanto más lento es el crecimiento de la población. Este menor crecimiento se refleja en una disminución en la pendiente. La homogeneidad en la evolución temporal de las curvas y la alta pendiente de éstas, incluso en las más altas concentraciones de ensayo, reflejan la alta resistencia del alga al tóxico para el rango de concentraciones seleccionado.

La gráfica correspondiente al ensayo sin aporte de nutrientes muestra un comportamiento distinto del alga respecto al ensayo con nutrientes. Para este ensayo, la concentración de 2 mg/L ejerce un efecto inhibitorio en el crecimiento del alga mostrándose este efecto como un curva inferior a la descrita por el control. Para el resto de concentraciones también se observa un mayor inhibición puesto que las pendientes de las curvas de crecimiento son menores que las obtenidas en el ensayo con nutrientes. Esta inhibición se hace máxima en la concentración de 10 mg/L en el periodo de exposición de 24 a 72 horas mostrando un crecimiento prácticamente nulo. A partir de las 72 horas, la población de esta concentración de LAS comienza a morir tal y como se puede apreciar en el descenso final de la curva.

Otra cuestión a destacar en la comparación de ambas gráficas es la magnitud de la concentración de biomasa medida. Véase la gran diferencia de escala de ambos ejes-y. La gráfica correspondiente al ensayo sin nutrientes muestra alrededor de tres veces menos concentración de biomasa que el ensayo con nutrientes.

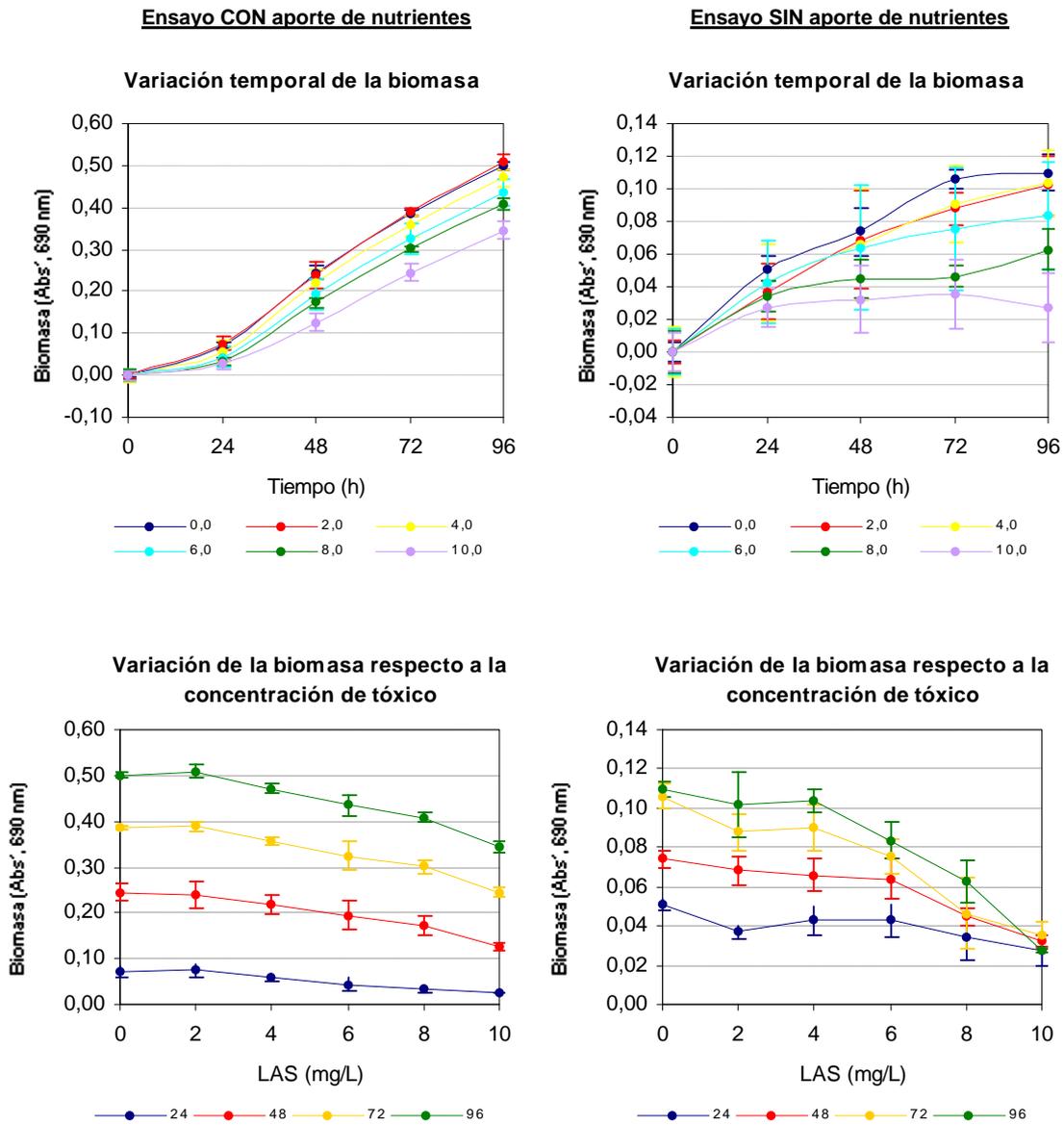


Figura C III.58. Ensayo de toxicidad del LAS e *I. galbana*. Agua de mar estándar

4.1.9.1.2. ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL LAS E *ISOCHRYSIS GALBANA*. RÍA DE HUELVA

Para la realización de esta experiencia se utilizó como matriz de ensayo aguas naturales procedente de la Ría de Huelva.

El agua de dilución H* se formó a partir de volúmenes iguales de muestras recogidas en los transeptos H1, H2 y H3. El contenido en nutrientes de H* en términos de C, N, P y Si fue el siguiente:

| Agua de dilución | C (mg/L) | N (mg/L) | P (mg/L) | Si (mg/L) |
|------------------|----------|----------|----------|-----------|
| H* | 27,45 | 0,172 | 0,057 | 0,046 |

En la figura C III.59. se muestra la evolución del ensayo en términos de biomasa normalizada.

La gráfica que representa el crecimiento de los tratamientos del ensayo con aporte de nutrientes es similar a las descritas en los ensayos con agua de mar sintética, si bien, la única diferencia notable es que las curvas de crecimiento de un importante número de concentraciones de ensayo se solapan gráficamente denotando el mismo crecimiento que el control y por tanto una ausencia en la inhibición del crecimiento. Esto es posible si pensamos que las aguas naturales contienen una gran número de nutrientes esenciales (macro y micronutrientes), vitaminas, oligoelementos, etc., muchas de los cuales no están presentes en los medios nutritivos sintéticos (Rand, 1995). Por tanto, la población se desarrolla en un medio "menos hostil" y por tanto puede "combatir" mejor ciertos niveles de tóxico. Para la concentración de 10 mg/L se observa el mismo crecimiento (misma pendiente y concentraciones de biomasa) que el obtenido en el ensayo estándar.

Respecto al ensayo realizado en las condiciones nutritivas de H*, se observa una gráfica muy similar a la obtenida en el ensayo con agua de mar estándar y sin aporte de nutrientes.

En relación con la concentración de biomasa normalizada alcanzados al final del periodo de ensayo, se observa que éstos se encuentran en los mismos niveles obtenidos para los ensayos en agua de mar estándar con y sin adición de nutrientes.

Respecto a las curvas dosis-respuesta, nuevamente se observa la misma evolución de los resultados que en los ensayos realizados en agua de mar estándar y en las dos condiciones nutricionales.

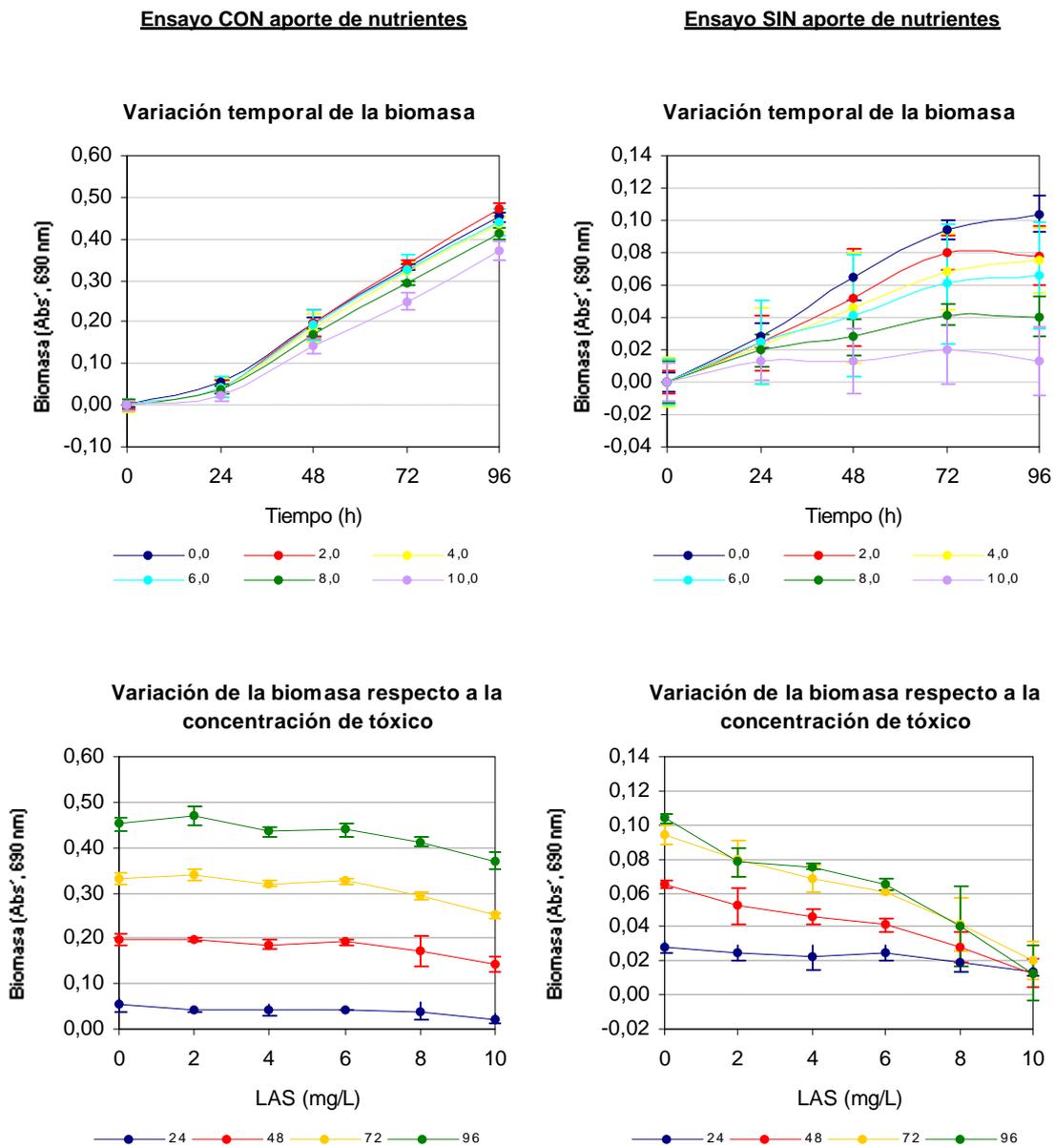


Figura C III.59. Ensayo de toxicidad del LAS e *I. galbana*. Aguas de la Ría de Huelva

4.1.9.1.3. ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL LAS E *ISOCHRYSIS GALBANA*. BAHÍA DE CÁDIZ

Para la realización de esta experiencia se utilizó como matriz de ensayo aguas naturales procedente de la Bahía de Cádiz.

El agua de dilución C* se formó a partir de volúmenes iguales de muestras recogidas en los transeptos C1, C2, C3 y C4. El contenido en nutrientes de C* en términos de C, N, P y Si fue el siguiente:

| Agua de dilución | C (mg/L) | N (mg/L) | P (mg/L) | Si (mg/L) |
|------------------|----------|----------|----------|-----------|
| C* | 31,17 | 0,109 | 0,013 | 0,120 |

En la figura C III.60. se muestran las gráficas de evolución temporal de la concentración de biomasa normalizada de los ensayo con y sin suplemento de medio nutriente.

Las gráficas muestran un comportamiento similar a los obtenidos en los ensayos con agua de mar estándar y en los ensayo con H*. La única diferencia significativa es que mientras que en los ensayos anteriores existe un pequeño periodo de latencia mostrándose como una suave pendiente ascendente desde el momento inicial hasta las 24 horas de exposición, en el ensayo realizado con aguas C* esta latencia es más marcada casi con ausencia de crecimiento de todos los tratamientos.

En la gráfica del ensayo sin nutrientes se observa claramente este periodo de latencia llegando incluso a producirse la muerte de parte de la población. En apartados anteriores se ha visto que *I. galbana* es un alga bastante resistente a las concentraciones de ensayo seleccionadas para este compuesto. Por ello, la razón de este descenso o inhibición del crecimiento durante las primeras horas de ensayo hay que buscarla en el hecho de que se haya podido producir un cierto estrés en el inóculo de ensayo durante el procedimiento de concentración, y no por efecto del agua de dilución. Mas aún cuando trascurrido este periodo de latencia, se recuperan las poblaciones para mostrar las mismas curvas que en ensayos anteriores. Sí hay que notar, que debido a esta latencia del crecimiento, al final del ensayo los valores de concentración de biomasa son ligeramente inferiores a los medidos en el ensayo con agua de mar estándar y con el agua de dilución H*.

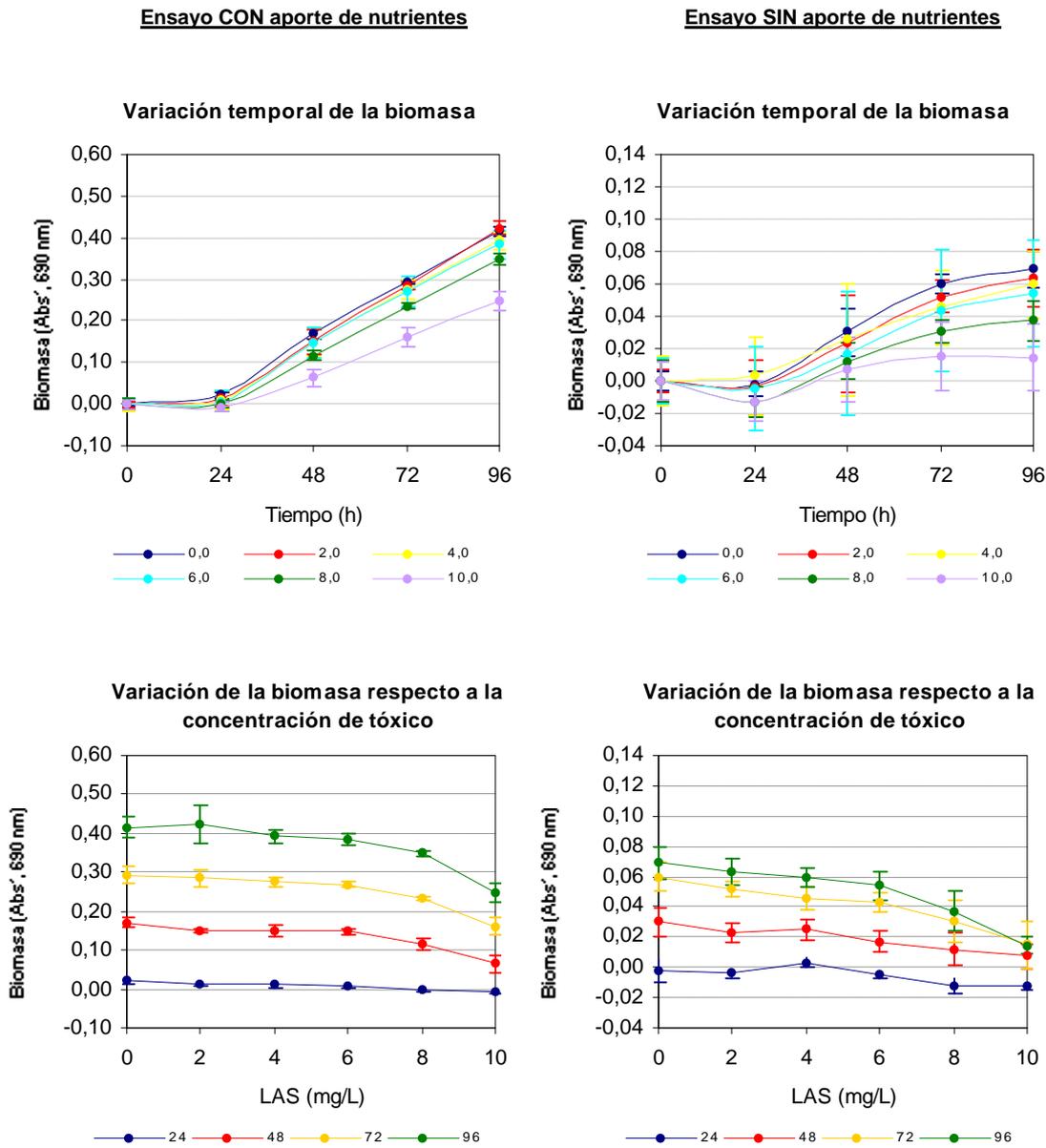


Figura C III.60. Ensayo de toxicidad del LAS e *I. galbana*. Aguas de la Bahía de Cádiz

4.1.9.1.4. ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL LAS E *ISOCHRYSIS GALBANA*. RÍO IRO

Para la realización de esta experiencia se utilizó como matriz de ensayo aguas naturales procedente del río Iro.

El agua de dilución I* se formó a partir de volúmenes iguales de muestras recogidas en las estaciones I2 e I4 a I8. El contenido en nutrientes de I* en términos de C, N, P y Si fue el siguiente:

| <i>Agua de dilución</i> | <i>C (mg/L)</i> | <i>N (mg/L)</i> | <i>P (mg/L)</i> | <i>Si (mg/L)</i> |
|-------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|
| I* | 44,03 | 2,402 | 0,463 | 0,372 |

En la figura C III.61. se muestra la evolución del ensayo en términos de biomasa normalizada.

Para los ensayos realizados utilizando agua de dilución procedente del río Iro hay que destacar dos aspectos.

El primero de ellos es que la concentración de biomasa final del ensayo con suplemento de nutrientes, es muy inferior a la obtenida al final de los otros ensayos. Para el ensayo realizado con C* se ha comentado que se produjo un periodo de latencia más prolongado del habitual el cual influyó en la concentración de biomasa final. En el ensayo con aguas I*, en este periodo se observa muerte de un porcentaje de la población de microalgas (pendiente negativa de la curva de crecimiento). Al haber un porcentaje de muerte mayor que en otros ensayos, la población tarda aún más en recuperarse. Puesto que esta situación también se produce en los tratamientos del control, la razón de esta muerte debe relacionarse con un inóculo estresado al comienzo del ensayo.

Una vez recuperada la población de los tratamientos se observa un crecimiento similar para todo el rango de concentraciones. Lo comentado para el ensayo con H* sobre nutrientes y otros compuesto presentes en el medio natural, es de aplicación para las aguas I*, y con mucha más importancia debido a las características del vertido que afecta a la calidad de las aguas del estuario del Río Iro.

El segundo de los aspectos a destacar es el hecho de que en el ensayo sin nutrientes, es decir, en las condiciones nutritivas naturales del Río Iro, la concentración de biomasa al final del ensayo del LAS es muy superior a las obtenidas en los ensayos con otras aguas de dilución. Además, la forma que adquieren el conjunto de curvas de crecimiento es muy parecido a la obtenida en el ensayo con nutrientes. En este medio natural, al no existir tanta limitación nutritiva, el alga es capaz de amortiguar el efecto del tóxico.

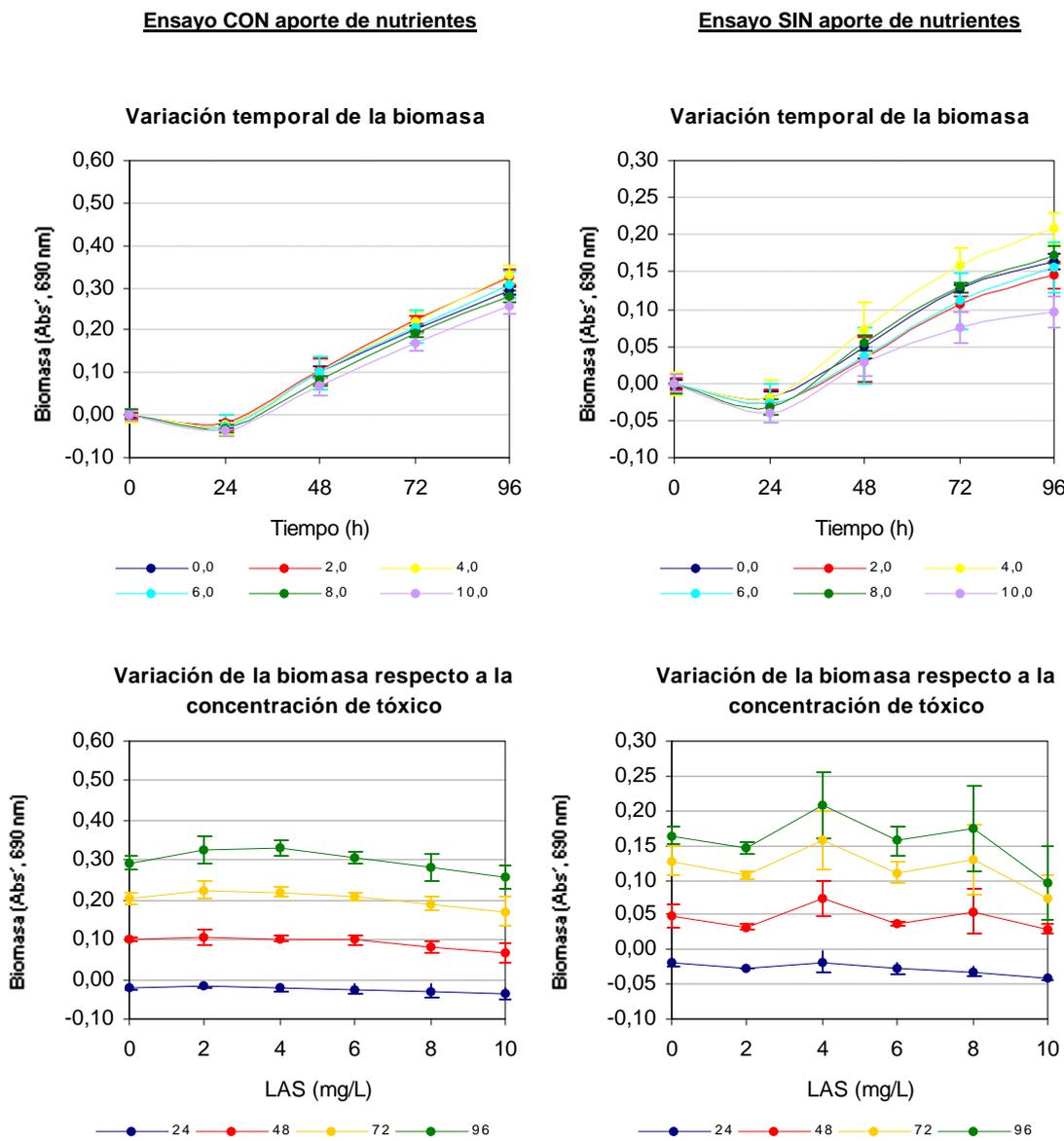


Figura C III.61. Ensayo de toxicidad del LAS e *I. galbana*. Aguas del Río Iro

4.1.9.1.5. ENSAYOS DE TOXICIDAD DEL LAS E *ISOCHRYSIS GALBANA*. BAHÍA DE ALGECIRAS

Para la realización de esta experiencia se utilizó como matriz de ensayo aguas naturales procedentes de la Bahía de Algeciras.

El agua de dilución Al* se formó a partir de volúmenes iguales de muestras recogidas en los transeptos Al1, Al2 y Al3. El contenido en nutrientes de Al* en términos de C, N, P y Si fue el siguiente:

| Agua de dilución | C (mg/L) | N (mg/L) | P (mg/L) | Si (mg/L) |
|------------------|----------|----------|----------|-----------|
| Al* | 30,21 | 0,302 | < 0,010 | 0,070 |

En la figura C III.62. se muestra la evolución del ensayo en términos de biomasa normalizada.

Nuevamente podemos observar en el ensayo con aporte de nutrientes como existe un periodo de latencia de 24 horas tras el cual la población se recupera y evoluciona de distinta forma en función de la concentración de tensioactivo presente en el medio.

Respecto al ensayo realizado en las condiciones nutricionales de la Bahía de Algeciras, se observa una gran diferencia con respecto los ensayos realizados con H*, C* e I*.

En las primeras horas de ensayo, el comportamiento con respecto a los otros ensayos es muy similar, sin embargo, transcurridas 72 horas de ensayo, se produce un cambio brusco en el comportamiento de todos los tratamientos incluido el control. Todos muestran una asintotización de las curvas, esto es se produce una inhibición completa del crecimiento, cuando no, muerte celular y disminución de la concentración de biomasa.

Puesto que el ensayo con nutrientes ha evolucionado de forma normal, la razón de este descenso no debe buscarse en un efecto "tóxico" del agua de dilución, sino en una limitación de nutrientes que produce un descenso incluso en la población control. En relación con la concentración de nutrientes obtenida para Al*, hay que resaltar las bajas concentraciones de fósforo de las aguas de ensayo. Puesto que no se dispone de datos numéricos que permitan evaluar otros nutrientes esenciales limitantes en producción primaria (p.e. hierro), las bajas concentraciones de fósforo permiten apuntar a la posibilidad de que éste sea la causa de la latencia o el decrecimiento de las poblaciones expuestas.

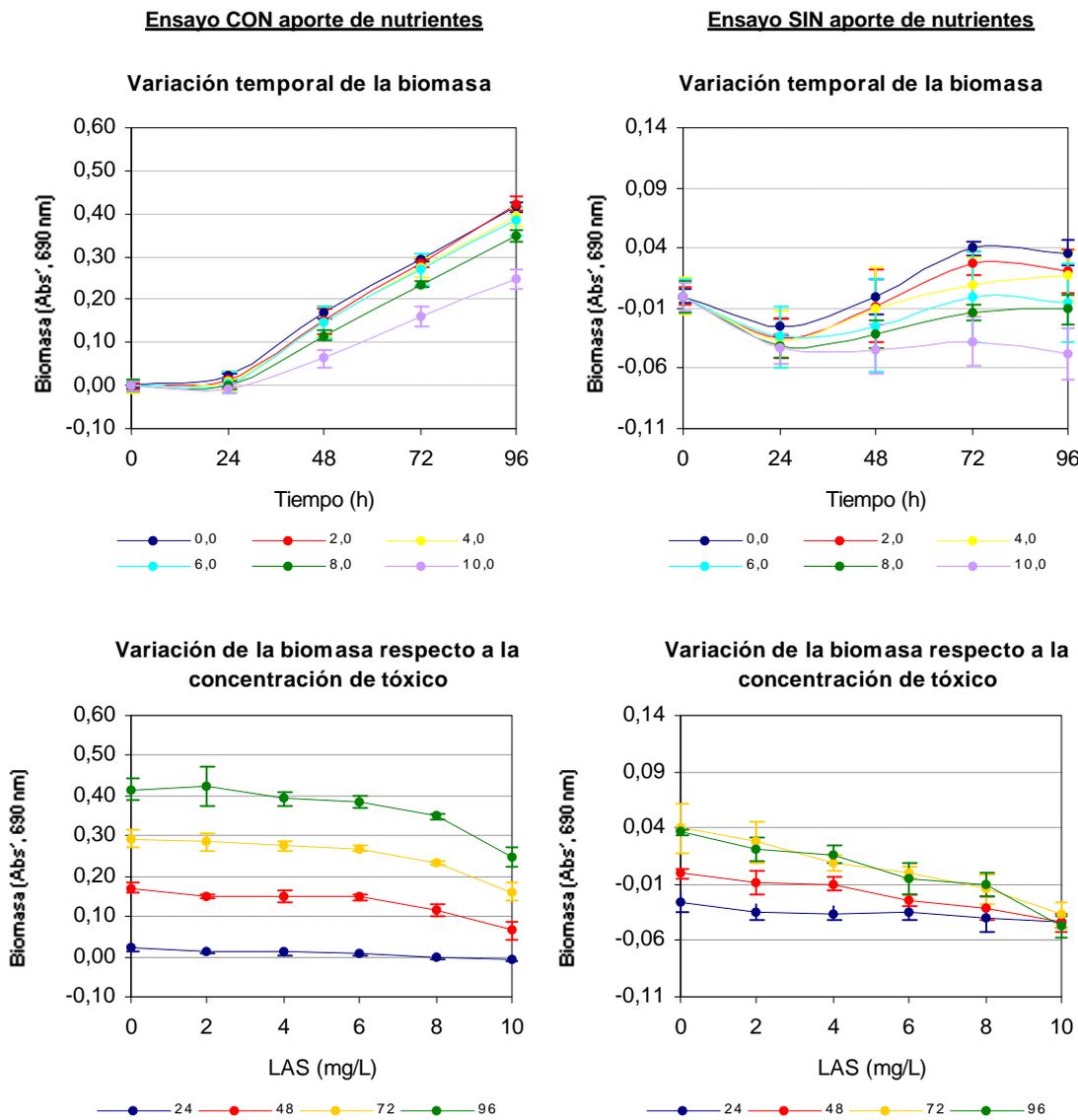


Figura C III.62. Ensayo de toxicidad del LAS e *I. galbana*. Aguas de la Bahía de Algeciras

4.1.9.2. DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS UMBRALES

Estudio de normalidad. Test de Shapiro Wilk

Para todos los ensayos incluidos en este estudio, se ha realizado el estudio de normalidad de los resultados obtenidos para los periodos de exposición de 72 y 96 horas mediante el test de Shapiro Wilk. Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla C III.62. W calculados en el ensayo de LAS con diferentes aguas de dilución. Ensayo CON aporte de nutrientes. Test de Shapiro Wilk

| Periodo de exposición | -Matriz de ensayo- | | | | | W crítico para $N=18$ y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| | Agua de mar estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras | |
| 72 h | 0,962 | 0,968 | 0,973 | 0,949 | 0,955 | 0,895 |
| 96 h | 0,958 | 0,947 | 0,972 | 0,977 | 0,930 | |
| | Normalidad para todos los t | Distribución normal si W calculada > W crítico |

Tabla C III.63. W calculados en el ensayo de LAS con diferentes aguas de dilución. Ensayo SIN aporte de nutrientes. Test de Shapiro Wilk

| | -Matriz de ensayo- | | | | | W crítico para $N=18$ y $\alpha=0,05$ |
|------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| | Agua de mar estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras | |
| 72 h | 0,964 | 0,970 | 0,945 | 0,950 | 0,955 | 0,895 |
| 96 h | 0,964 | 0,971 | 0,963 | 0,940 | 0,951 | |
| | Normalidad para todos los t | Distribución normal si W calculada > W crítico |

Como puede apreciarse en ambas tablas, se cumple la condición de normalidad en todos los ensayos y en ambos periodos de exposición.

Estudio de homogeneidad de la varianza. Test de Barlett

De la aplicación del test de Barlett, se obtuvo el estadístico B el cual define la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados obtenidos en los ensayos fueron los siguientes:

Tabla C III.64. B calculados en el ensayo de LAS con diferentes aguas de dilución. Ensayo CON aporte de nutrientes. Test de Barlett

| Periodo de exposición | -Matriz de ensayo- | | | | | B crítico para 10 grados de libertad y $\alpha=0,05$ |
|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| | Agua de mar estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras | |
| 72 h | 6,66 | 1,43 | 4,67 | 4,28 | 3,26 | 11,07 |
| 96 h | 2,95 | 1,18 | 5,98 | 2,67 | 2,10 | |
| | Normalidad para todos los t | Varianza homogénea si B calculada < B crítico |

Tabla C III.65. B calculados en el ensayo de LAS con diferentes aguas de dilución. Ensayo SIN aporte de nutrientes. Test de Barlett

| | -Matriz de ensayo- | | | | | B crítico para 10 grados de libertad y $\alpha=0,05$ |
|------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--|
| | Agua de mar estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras | |
| 72 h | 2,55 | 6,83 | 3,15 | 7,56 | 4,32 | 11,07 |
| 96 h | 9,66 | 7,61 | 1,76 | 8,24 | 3,14 | |
| | Normalidad para todos los t | Varianza homogénea si B calculada < B crítico |

Los resultados mostrados en las tablas indican homogeneidad de la varianza en todos los casos.

Determinación de los efectos umbrales. Test de Dunnett

Una vez comprobadas las condiciones de normalidad y de homogeneidad de la varianza, se procedió al cálculo de los efectos umbrales a partir del test de Dunnett y las pruebas *t* individuales. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla C III.66. t calculadas en el ensayo de LAS con diferentes aguas de dilución. Ensayo CON aporte de nutrientes (t=72 h). Método de Dunnett

| mg/L LAS | -Matriz de ensayo- | | | | | T crítica para 12 grados de libertad y 5 concentraciones |
|----------|----------------------|---------------|----------------|---------|--------------------|---|
| | Agua de mar estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras | |
| 2,0 | -0,31 | -1,10 | 0,65 | -1,37 | -1,65 | 2,50 |
| 4,0 | 2,37 | 1,47 | 1,45 | -0,98 | -1,40 | * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 6,0 | 4,82 (*) | 0,83 | 1,85 | -0,35 | -0,63 | |
| 8,0 | 6,66 | 5,20 (*) | 4,44 (*) | 0,76 | 3,15 (*) | |
| 10,0 | 11,04 | 11,22 | 9,98 | 1,96 | 6,41 | |

Tabla C III.67. t calculadas en el ensayo de LAS con diferentes aguas de dilución. Ensayo CON aporte de nutrientes (t=96 h). Método de Dunnett

| mg/L LAS | -Matriz de ensayo- | | | | | T crítica para 12 grados de libertad y 5 concentraciones |
|----------|----------------------|---------------|----------------|---------|--------------------|---|
| | Agua de mar estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras | |
| 2,0 | -0,79 | -1,50 | -0,35 | -1,50 | -3,10 (**) | 2,50 |
| 4,0 | 2,38 | 1,29 | 1,13 | -1,75 | -1,64 | * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 6,0 | 5,48 (*) | 0,97 | 1,57 | -0,63 | -1,62 | |
| 8,0 | 7,78 | 3,09 (*) | 3,19 (*) | 0,60 | 2,36 | |
| 10,0 | 13,22 | 6,47 | 7,96 | 1,65 | 4,97 (*) | |

(**) Sobrecrecimiento

Tabla C III.68. t calculadas en el ensayo de LAS con diferentes aguas de dilución. Ensayo SIN aporte de nutrientes (t=72 h). Método de Dunnett

| mg/L LAS | -Matriz de ensayo- | | | | | T crítica para 12 grados de libertad y 5 concentraciones |
|----------|----------------------|---------------|----------------|---------|--------------------|---|
| | Agua de mar estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras | |
| 2,0 | 2,05 | 1,75 | 0,91 | 0,80 | 1,07 | 2,50 |
| 4,0 | 1,75 | 3,16 (*) | 1,75 | -1,18 | 2,62 (*) | * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 6,0 | 3,40 (*) | 4,16 | 1,99 | 0,61 | 3,46 | |
| 8,0 | 6,68 | 6,58 | 3,50 (*) | -0,09 | 4,64 | |
| 10,0 | 7,95 | 9,20 | 5,36 | 2,02 | 6,65 | |

Tabla C III.69. *t* calculadas en el ensayo de LAS con diferentes aguas de dilución. Ensayo SIN aporte de nutrientes (t=96 h). Método de Dunnett

| mg/L LAS | -Matriz de ensayo- | | | | | T crítica para 12 grados de libertad y 5 concentraciones |
|-------------|----------------------|---------------|----------------|---------|--------------------|---|
| | Agua de mar estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras | |
| 2,0 | 1,04 | 4,70 (*) | 0,74 | 0,59 | 1,79 | 2,50 |
| 4,0 | 0,82 | 5,18 | 1,22 | -1,34 | 2,36 | * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha = 0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). |
| 6,0 | 3,42 (*) | 6,99 | 1,96 | 0,25 | 5,00 (*) | |
| 8,0 | 6,14 | 10,00 | 4,14 (*) | -0,27 | 5,69 | |
| 10,0 | 10,77 | 15,61 | 7,11 | 2,06 | 10,19 | |

El asterisco insertado al lado de la *t* calculada indica el límite umbral de efecto. Las NOEC y las LOEC que definen estas *t* calculadas son las siguientes:

Tabla C III.70. Valores NOEC y LOEC obtenidos en el ensayo del LAS con diferentes aguas de dilución. Ensayo CON aporte de nutrientes

| 72 h | -Matriz de ensayo- | | | | |
|------|----------------------|---------------|----------------|---------|-------------------------|
| | Agua de mar estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras |
| NOEC | 4,0 | 6,0 | 6,0 | 10,0 | 6,0 |
| LOEC | 6,0 | 8,0 | 8,0 | > 10,0 | 8,0 |
| 96 h | Agua de mar estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras |
| NOEC | 4,0 | 6,0 | 6,0 | 10,0 | 4,0 ⁽¹⁾ 8,0 |
| LOEC | 6,0 | 8,0 | 8,0 | > 10,0 | 2,0 ⁽¹⁾ 10,0 |

⁽¹⁾ Valores umbrales para sobrecrecimiento

Tabla C III.71. Valores NOEC y LOEC obtenidos en el ensayo del LAS con diferentes aguas de dilución. Ensayo SIN aporte de nutrientes

| 72 h | Microalgas Marinas | | | | |
|------|----------------------|---------------|----------------|---------|--------------------|
| | Agua de mar estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras |
| NOEC | 4,0 | 2,0 | 6,0 | 10,0 | 4,0 |
| LOEC | 6,0 | 4,0 | 8,0 | > 10,0 | 6,0 |
| 96 h | Agua de mar estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras |
| NOEC | 4,0 | <2,0 | 6,0 | 10,0 | 4,0 |
| LOEC | 6,0 | 2,0 | 8,0 | > 10,0 | 6,0 |

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos con nutrientes, se observa que los test realizados con aguas naturales muestran una mayor resistencia al tóxico lo cual indica que la presencia de micronutrientes en las aguas favorece la actividad vital del alga y su resistencia a los compuestos.

Con relación a las zonas estudiadas, la Ría de Huelva, Bahía de Cádiz y Bahía de Algeciras muestran niveles umbrales de efecto similares. Las aguas del Río Iro presentan una mayor resistencia al LAS y no manifiestan efecto tóxico para ninguna de las concentraciones de LAS ensayadas.

Respecto a los ensayos en condiciones naturales, los niveles umbrales obtenidos con aguas de la Bahía de Cádiz y el Río Iro son idénticos a los obtenidos en los ensayos con aportes de nutrientes. Sin embargo, utilizando agua de dilución de la Ría de Huelva y Bahía de Algeciras en condiciones naturales, se observa un aumento de sensibilidad de las algas al tóxico. Tal y como refleja la tabla, en el caso de la Ría de Huelva esta sensibilidad aumenta con el tiempo de exposición.

4.1.9.3. DETERMINACIÓN DE LOS IC_p

Mediante el método IC_p, se calcularon las concentraciones de inhibición para diversos porcentajes de efecto. Los resultados fueron los siguientes:

Tabla C III.72. Valores de IC_p experimentales obtenidos para *L. galbana* expuesta a diferentes concentraciones de LAS en diferentes aguas de dilución CON adición de nutrientes

| t (h) | % inh. | -Matriz de ensayo- | | | | |
|-------|--------|----------------------|---------------|----------------|---------|--------------------|
| | | Agua de mar estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras |
| 72 | 5 | 3,1965 | 5,9207 | 3,1134 | 6,2943 | 6,3929 |
| | 25 | 8,3117 | | 8,3643 | | 9,0652 |
| | 50 | | | | | |
| | 75 | | | | | |
| | 95 | | | | | |
| 96 | 5 | 3,5794 | 7,1488 | 3,3388 | 6,623 | 6,5427 |
| | 25 | 8,9403 | | 8,6076 | | |
| | 50 | | | | | |
| | 75 | | | | | |
| | 95 | | | | | |

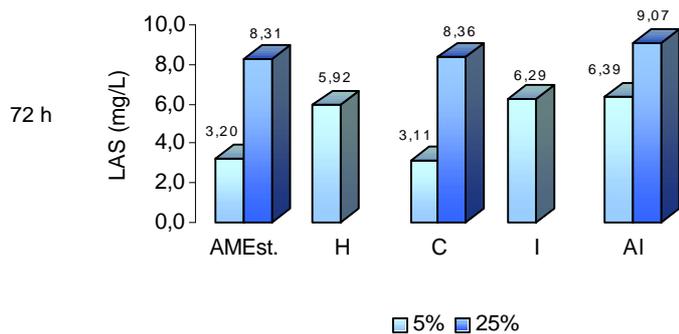
Tabla C III.73. Valores de IC_p experimentales obtenidos para *L. galbana* expuesta a diferentes concentraciones de LAS en diferentes aguas de dilución SIN adición de nutrientes

| t (h) | % inh. | -Matriz de ensayo- | | | | |
|-------|--------|----------------------|---------------|----------------|---------|--------------------|
| | | Agua de mar estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras |
| 72 | 5 | 0,734 | 2,2142 | 1,067 | 5,2641 | 0,7845 |
| | 25 | 5,3264 | 6,0557 | 4,621 | 8,6051 | 1,6831 |
| | 50 | 7,6732 | 8,4103 | 8,0585 | | 2,69 |
| | 75 | | | | | 3,9588 |
| | 95 | | | | | 5,7667 |
| 96 | 5 | 2,2176 | 0,4175 | 1,8851 | 6,5408 | 0,3033 |
| | 25 | 6,0731 | 2,5001 | 5,9847 | 8,8333 | 1,3918 |
| | 50 | 8,3921 | 7,6297 | 8,1563 | | 3,2014 |
| | 75 | | 9,4647 | 9,6713 | | 4,887 |
| | 95 | | | | | 5,9725 |

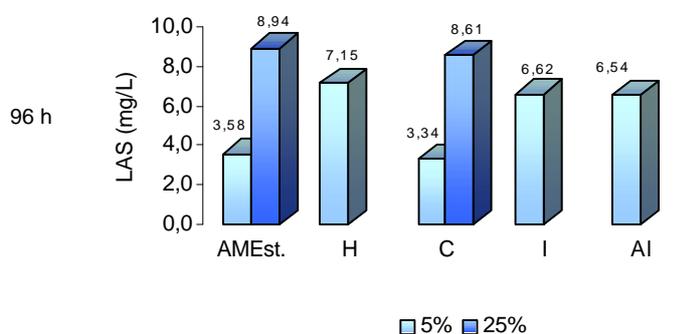
Todas las celdas en blanco indican que experimentalmente no se ha obtenido porcentajes de inhibición superiores a los correspondientes a estas celdas.

Mediante la figura C III.63. se representan las IC_p obtenidas para cada agua de dilución.

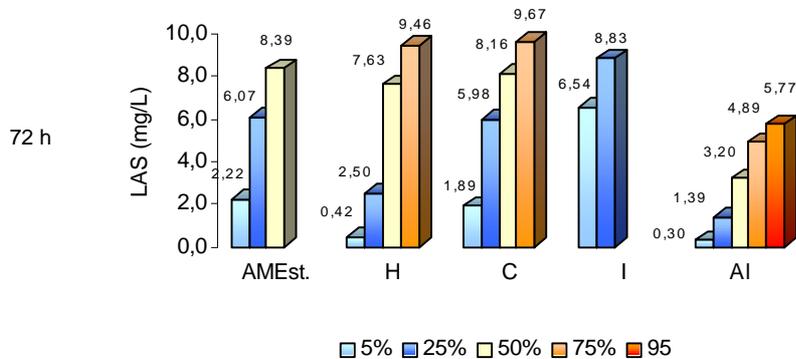
Ensayo con aporte adicional de nutrientes



Ensayo con aporte adicional de nutrientes



Ensayo sin aporte adicional de nutrientes



Ensayo sin aporte adicional de nutrientes

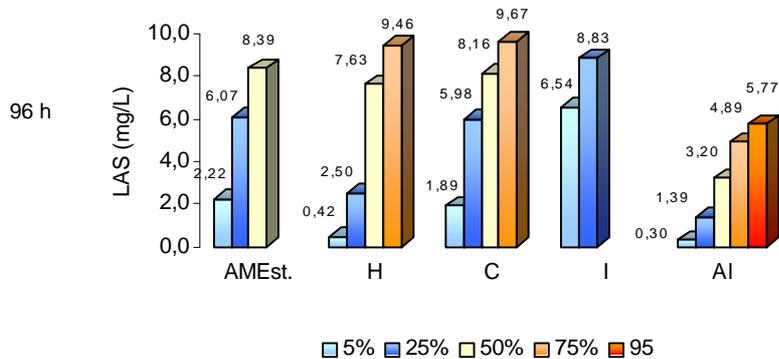


Figura C III.63. Representación gráfica de los valores de diferentes valores de ICp. Periodo de exposición de 72 horas

De los resultados obtenidos para ambos ensayos y en ambos periodos de exposición hay que destacar las observaciones que se realizan a continuación.

Para el rango de concentraciones estudiadas, los ensayos con aporte de nutrientes no permiten calcular concentraciones de efecto superiores al 5 o el 25%.

En los ensayos en condiciones naturales, el alga está sometida a dos fuentes de estrés: nutrientes y tóxico. Por tanto, se obtiene una gama amplia de respuestas y es posible determinar mayor número de IC_p.

En los ensayos con nutrientes se observa en general que al aumentar el tiempo de exposición, aumentan los valores IC_p, esto es, el alga se adapta al tóxico independientemente de la matriz de ensayo. En cambio, en los ensayos realizados con aguas en condiciones naturales se observan diferencias en el comportamiento dependiendo de la matriz de ensayo considerada. Para I* y C* se observa un aumento en los valores IC_p, sin embargo, para el caso de los ensayos realizados con agua H* y Al*, los IC_p disminuyen al aumentar el tiempo de exposición, esto es los resultados muestran una mayor toxicidad al LAS.

Respecto a este último párrafo hay que significar que observando las concentraciones de nutrientes naturales de esta agua de dilución, no existe una relación directa entre concentración de nutrientes y resistencia al tóxico. Por ejemplo, en la Ría de Huelva se han medido concentraciones de nutrientes superiores a las obtenidas en la Bahía de Cádiz., sin embargo, estas últimas ejercen un menor estrés a las algas. No hay que olvidar que las aguas naturales no sólo contienen N, P, C y Si. También pueden estar presentes un gran número de compuestos que, o bien interaccionan entre sí, o con el compuesto y/o con los organismos de ensayo (Abel y Axiac, 1991; Lewis *et al.*, 1994). Ya se ha comentado con anterioridad que pueden estar presentes micronutrientes que estimulan el crecimiento de las algas, pero también pueden encontrarse en disolución compuestos que afectan a la toxicidad, bien aumentándola o bien disminuyéndola.

En el caso de los ensayos realizados con aguas Al* ya se ha comentado con anterioridad la limitación que existe en fósforo lo cual apunta a que sea la principal causa por la que se obtienen resultados de toxicidad más elevados. El caso de la Ría de Huelva apunta a que sea la matriz de ensayo la causante del aumento de toxicidad.

Finalmente, en función de los valores LC₅₀ se ha representado una escala de áreas litorales en función a su toxicidad al LAS (ensayos sin nutrientes):

| | ← Mayor toxicidad | | Menor toxicidad → | |
|-------------|--------------------|----------------|-------------------|---------|
| 72 h | Bahía de Algeciras | Bahía de Cádiz | Ría de Huelva | Río Iro |
| 96 h | Bahía de Algeciras | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro |

Antes de finalizar este apartado es necesario realizar una reflexión acerca de la "calidad" de los sistemas acuáticos. Cuando se definen estándares de calidad físico-químicos se tiende a pensar que cuanto más bajos sean los niveles del compuesto en las aguas, ésta será de mayor calidad. En el *Capítulo II* de la presente memoria se realizó un análisis del contenido de nutrientes de cuatro áreas litorales de estudio. Del análisis y el conjunto de conclusiones que se elaboraron en ese capítulo hay que señalar dos de ellas:

- En la Bahía de Algeciras, la calidad de las aguas puede considerarse como intermedia-buena. Destacar que este área ambiental mostró los niveles de fósforo disuelto más bajos (<0,010 mg/L P-PO₄³⁻).

- El Río Iro es el área litoral de estudio que presenta aguas de peor calidad mostrando los máximos de los parámetros físico-químicos (Capítulo II, apartado 4.5). De las aguas de dilución utilizadas en los ensayos, destaca la concentración de fósforo del agua I' (0,463 mg/L P-PO₄³⁻).

En función del término "calidad", el medio acuático de la Bahía de Algeciras debe ser más óptimo para vivir que las aguas del Río Iro, y sin duda esto ocurre así para la gran mayoría de los organismos acuáticos. Para el caso de las algas y en función de los resultados obtenidos en este ensayo no podría decirse lo mismo, el caso sería el contrario puesto que las comunidades de microalgas son capaces de combatir la toxicidad de los compuestos químicos en aguas con gran contenido en nutrientes como es el caso del Río Iro. Con esto no se pretende decir que es mejor que en las aguas marinas exista un gran contenido de nutrientes. De todos es conocido los graves problemas que conlleva estos excesos (eutrofización, blooms de algas, etc.). Lo que se quiere expresar es que es necesario llegar a un compromiso y determinar como estado de "calidad" una situación intermedia (p.e. la Bahía de Cádiz).

4.1.9.4. CONCLUSIONES OBTENIDAS A PARTIR DE ESTOS ESTUDIOS

De los resultados obtenidos a lo largo de estos ensayos se apuntan las siguientes conclusiones:

- I. La matriz de ensayo es un factor determinante en los ensayos de toxicidad del LAS.
- II. En condiciones no limitantes de nutrientes, se obtiene mayor toxicidad en los ensayos realizados con agua de mar sintética, por tanto para este compuesto el procedimiento estándar sobreestima la toxicidad del compuesto.
- III. Los resultados obtenidos en los ensayos realizados en condiciones reales permiten afirmar que el contenido en nutrientes de las aguas receptoras es decisivo para la toxicidad del LAS. En aquellos medios donde la concentración de nutrientes es elevada, la toxicidad de los compuestos disminuye para los productores primarios. Por el contrario, en aquellos sistemas acuáticos en los cuales exista alguna limitación marcada en uno (o varios) de los nutrientes esenciales, la toxicidad aumenta considerablemente puesto que las algas se encuentran con varios factores de estrés al mismo tiempo.
- IV. En principio, las experiencias sin aporte de nutrientes representan mejor las condiciones reales del medio natural. La respuesta tóxica en estas condiciones tienden a ser mayor, por tanto, se recomienda utilizar este tipo de ensayos para la elaboración de estándares de calidad ambiental en zonas específicas.
- V. Si bien este estudio se ha realizado exclusivamente para el LAS, es presumible pensar que las microalgas presenten diversos grados de toxicidad a compuestos químicos dependiendo del medio acuático o la zona litoral en la que habiten.

4.2. RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS DE AGUAS RECEPTORAS. OBTENCIÓN DEL ÍNDICE DE EUTROFIZACIÓN - I_E -

En este apartado se comentan los resultados obtenidos en los ensayos de aguas receptoras (Lewis *et al.*, 1994) realizados con microalgas marinas y las aguas procedentes de las zonas litorales de estudio. En el anexo XI del presente documento, puede consultarse de forma detallada estos resultados.

Como ya se expuso en el apartado 3.1.3.2.3 del presente capítulo, para la obtención del índice I_E se realizaron dos ensayos paralelos: (A) ensayo en condiciones naturales de nutrientes, y (B) ensayo en condiciones no limitantes de nutrientes, es decir, adicionando a las muestras, medio f/2. Para cada ensayo, se estudió la evolución de la biomasa del cultivo durante 10 días. Finalizado el ensayo, se procedió a calcular los I_E de cada microalga en cada periodo de exposición (Anexo XI).

Puesto que se ha definido un nuevo índice de calidad, es necesario conocer el comportamiento de éste al objeto de hacer la mejor interpretación posible de los resultados.

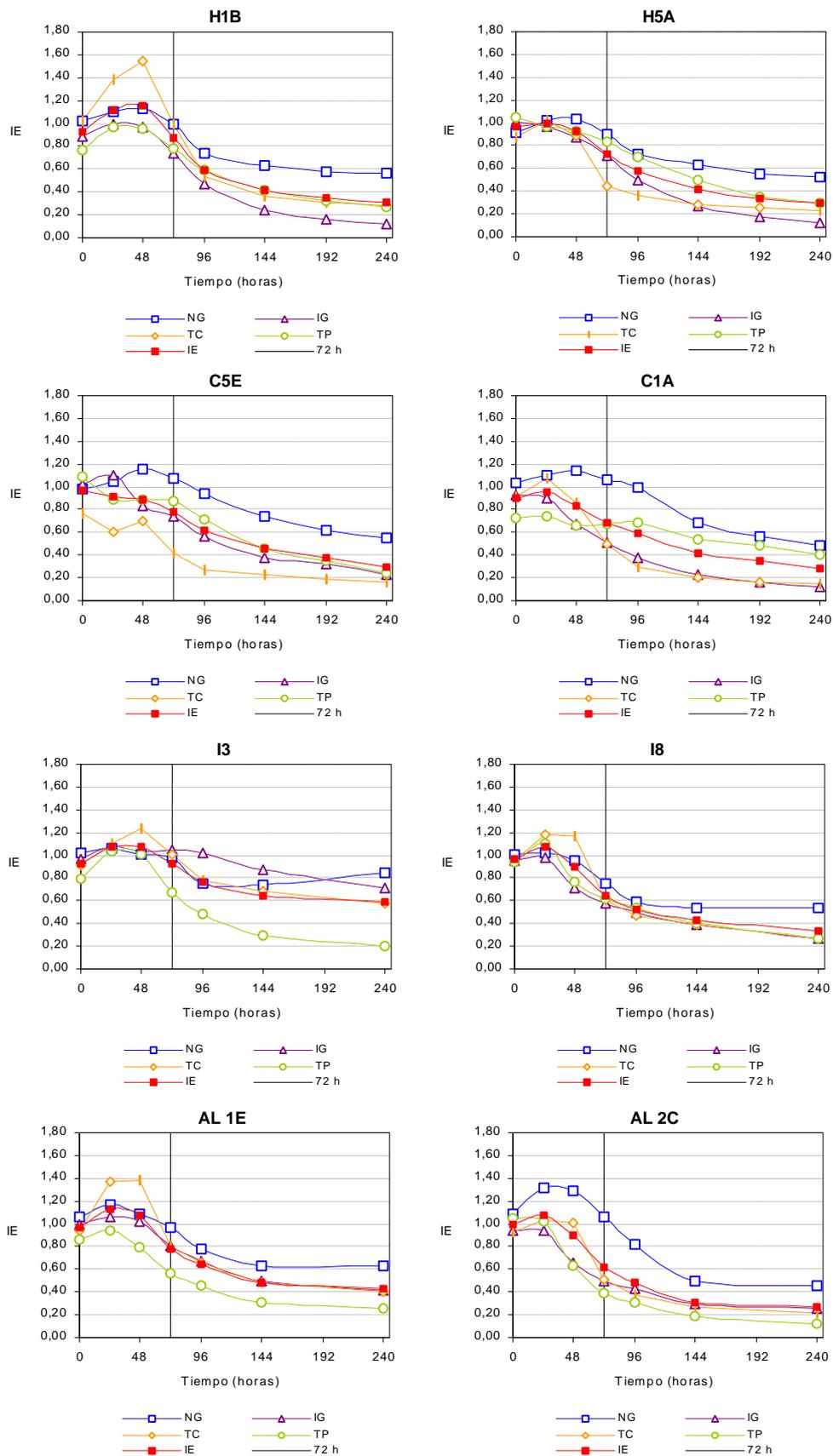
4.2.1. ANÁLISIS DEL I_E

4.2.1.1. EVOLUCIÓN TEMPORAL DEL I_E

Para cada periodo de exposición se calcularon los I_E de cada alga. Las siguientes gráficas muestran la evolución temporal de estos índices. Para ilustrar esta evolución, se han seleccionado dos estaciones de muestreo en cada área litoral de estudio (Figura C III.63).

Las figuras muestran como existe un patrón de comportamiento del índice en todas las algas. En el momento de inicio del ensayo el I_E se sitúa en torno a 1 indicando que la cantidad de biomasa inicial es similar en ambos ensayos (con y sin nutrientes). En las primeras horas de exposición, se obtiene un aumento en el valor del índice adquiriendo valores por encima de 1, lo cual indica que la población expuesta a las muestras en condiciones naturales presentan valores superiores de biomasa que la población expuesta a las muestras abonadas con medio nutritivo. A priori puede pensarse que estos valores no son lógicos ya que el medio en condiciones naturales tiene niveles de nutrientes muy inferiores al aporte que se realiza con el medio f/2. Con anterioridad se comentó que algunos autores han detectado un cierto efecto fitotóxico producido por el medio nutritivo. Para estos ensayos ésta puede ser una posible explicación, y por tanto se justifica el aumento en el I_E. Este efecto se manifiesta en diferente magnitud dependiendo de la especie de ensayo. Otro factor que influye es la matriz de ensayo. Para un alga concreta, el aumento en el I_E varía dependiendo de la muestra ensayada. Por tanto, para las primeras 48 horas de ensayo puede decirse que existe una interacción entre el medio nutritivo sintético y las características naturales de las aguas lo cual produce un descenso en la velocidad de crecimiento de la población de las algas expuesta, y por tanto, se obtiene un aumento en los valores de I_E. Los valores obtenidos en este periodo, no deben considerarse en el análisis de los resultados puesto que no reflejan el significado para el cual se diseñó el índice.

El periodo de exposición tradicional para expresar la toxicidad de compuestos químicos en algas es de 72 horas. En las gráficas se observa que transcurrido este periodo de ensayo, la respuesta tóxica descrita en el párrafo anterior ha desaparecido, comenzando a obtenerse I_E representativos del ensayo. A las 72 horas, la población que crece en condiciones naturales comienza a presentar limitaciones de nutrientes frente a la población que crece en condiciones no limitadas. En estos momentos, el índice desciende por debajo de 1. A partir de los 6 días de exposición (144 horas) el índice se asintotiza (o disminuye lentamente) debido a que se han agotado los nutrientes del ensayo en condiciones naturales.



NG: I_E de *Nannochloropsis gaditana*; IG: I_E de *Isochrysis galbana*; TC: I_E de *Tetraselmis chuii*; TS: I_E de *Thalassiosira pseudonana*.
 IE: Índice de Eutrofización Global (promedio de los IE de cada alga)

Figura C III.63. Variación temporal del I_E para diferentes muestras ambientales

Por tanto y en función de estos resultados, se ha considerado más conveniente analizar los resultados del índice en dos periodos de exposición distintos: 72 y 240 horas. Las 72 horas representan el periodo en el cual se detectan respuestas umbrales del ensayo. La respuesta obtenida a las 240 horas representa el valor estable del índice. Cuanto mayor sea este último, mayor será el riesgo de eutrofización que presenta la muestra ensayada. Multiplicando el índice obtenido por 100, se obtendría el porcentaje de riesgo de eutrofización.

El índice presenta un límite inferior el cual es difícil de rebasar. El inóculo que se fabricó para la realización de los ensayos procedía de un cultivo sano en fase exponencial de crecimiento. En el procedimiento de concentración de las algas, éstas se lavan varias veces con agua de mar sintética para eliminar todo resto de medio de cultivo enriquecido. Por otra parte, las algas que crecen en un medio enriquecido presentan reservas internas las cuales pueden usar durante un corto periodo de tiempo para sus funciones vitales, por ejemplo, reproducción (Kooijman, 2000). El inóculo de ensayo presenta estas características y por tanto, para estimar el crecimiento producido por reservas internas, se construyó para cada alga lo que se ha denominado *control del inóculo*, consistente en exponer el inóculo de ensayo a agua de mar sintética libre de nutrientes. Los resultados de biomasa obtenidos para este control pueden relacionarse con el control del ensayo (inóculo en agua de mar sintética y medio f/2) para obtener el I_E LÍMITE del ensayo. Cualquier muestra ambiental que presente nutrientes en el medio permitirá crecer a la población de algas más que el *control del inóculo*. Cualquier I_E que muestre un valor inferior al I_E LÍMITE significa que la velocidad de crecimiento está afectada por el efecto tóxico de compuestos presentes en las muestras ambientales.

4.2.1.2. VARIACIÓN DEL I_E ENTRE ESPECIES DE ALGAS

En el apartado relativo a la toxicidad de compuestos específicos se comprobó que la toxicidad varía en función de la especie de ensayo, y se concluyó que una batería de ensayos aporta una visión más representativa de la toxicidad que la selección de un única especie. Siguiendo esta premisa, para la realización de los ensayos de medio receptor se seleccionaron cuatro especies de microalgas marinas. Los resultados mostrados en las gráficas anteriores revelan diferentes formas de las curvas de I_E frente al tiempo, lo cual indica que cada alga se comporta de forma diferente ante la misma muestra ambiental.

Para ver cómo es este comportamiento específico se han construido las siguientes gráficas. En la figura C III.64 se representa la variación temporal de los I_E de cada alga en varias muestras ambientales pertenecientes a la Ría de Huelva. En la figura CIII.65 se representa la variación temporal de los I_E del alga *I. galbana* en muestras pertenecientes a las cuatro áreas litorales de estudio.

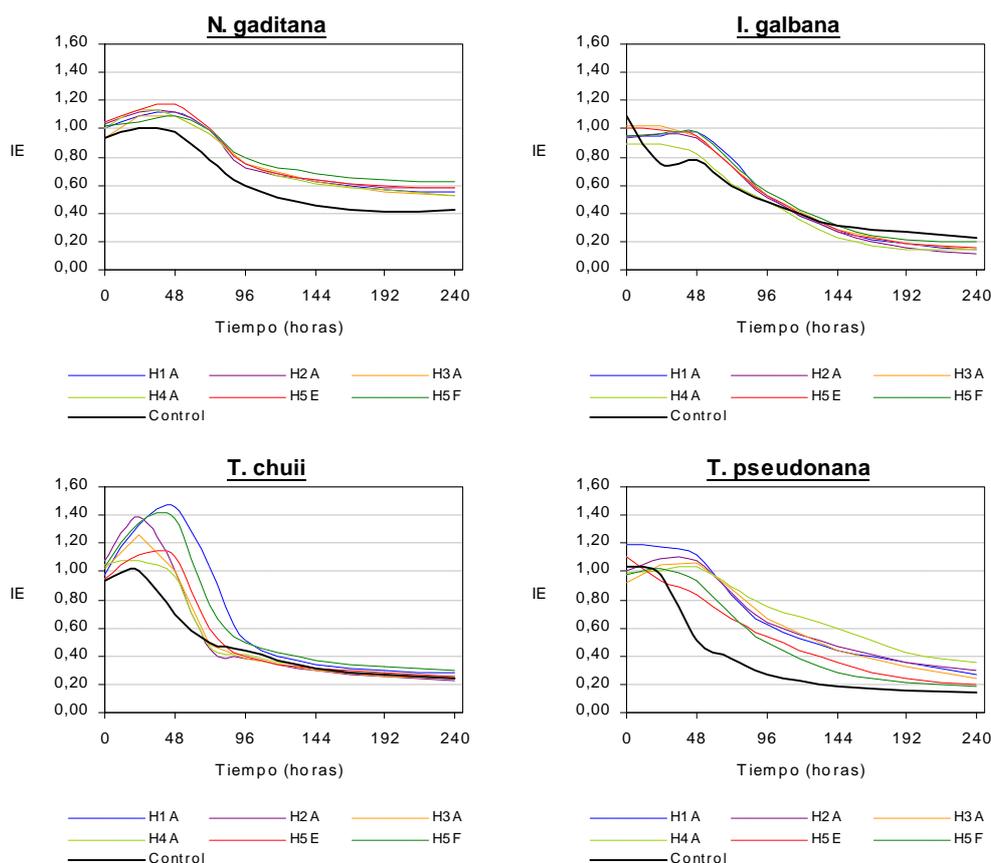


Figura C III.64. Variación temporal de los I_E en diferentes muestras ambientales

La línea continua representa la evolución del I_E LIMITE, es decir, el índice calculado con el control del inóculo y el control de ensayo.

Las diferentes curvas obtenidas en cada gráfica muestra el efecto de la muestra ambiental, en el crecimiento del alga y por tanto en el I_E .

La sensibilidad del índice también depende del alga de ensayo. Así, *N. gaditana* e *I. galbana* muestran curvas de variación temporal del I_E muy similares durante todo el periodo de exposición, es decir, estas algas responden de forma similar frente a muestras pertenecientes a cualquier localización dentro de la Ría de Huelva. *T. chuii* y *T. pseudonana* muestran diferentes respuestas para cada muestra ambiental. Para estas algas, la variabilidad observada en las curvas durante las primeras horas de exposición denotan el efecto fitotóxico producido por la interacción entre la matriz de ensayo y el medio nutriente y reflejado en el valor de los I_E . A medida que transcurre el tiempo, este efecto disminuye y se asintotizan los valores de I_E . Para el caso de *T. chuii*, los valores de I_E a los 10 días de exposición revelan que para este periodo de exposición crónica, el alga muestra un comportamiento similar para cualquier muestra de la ría. En el caso de *T. pseudonana*, la diferencia en los valores del índice a los 10 días indica una variabilidad espacial en el comportamiento del alga.

Otro aspecto interesante a considerar en estas gráficas es la posición relativa que toman las curvas respecto al I_E de los controles. Para las algas *N. gaditana* y *T. pseudonana* se observa durante todo el periodo de exposición, valores de los índices superiores a los I_E LIMITE, sin embargo, para *T. chuii* e *I. galbana* se observa una respuesta tóxica crónica a las muestras ambientales puesto que los I_E calculados son inferiores a los I_E LIMITE.

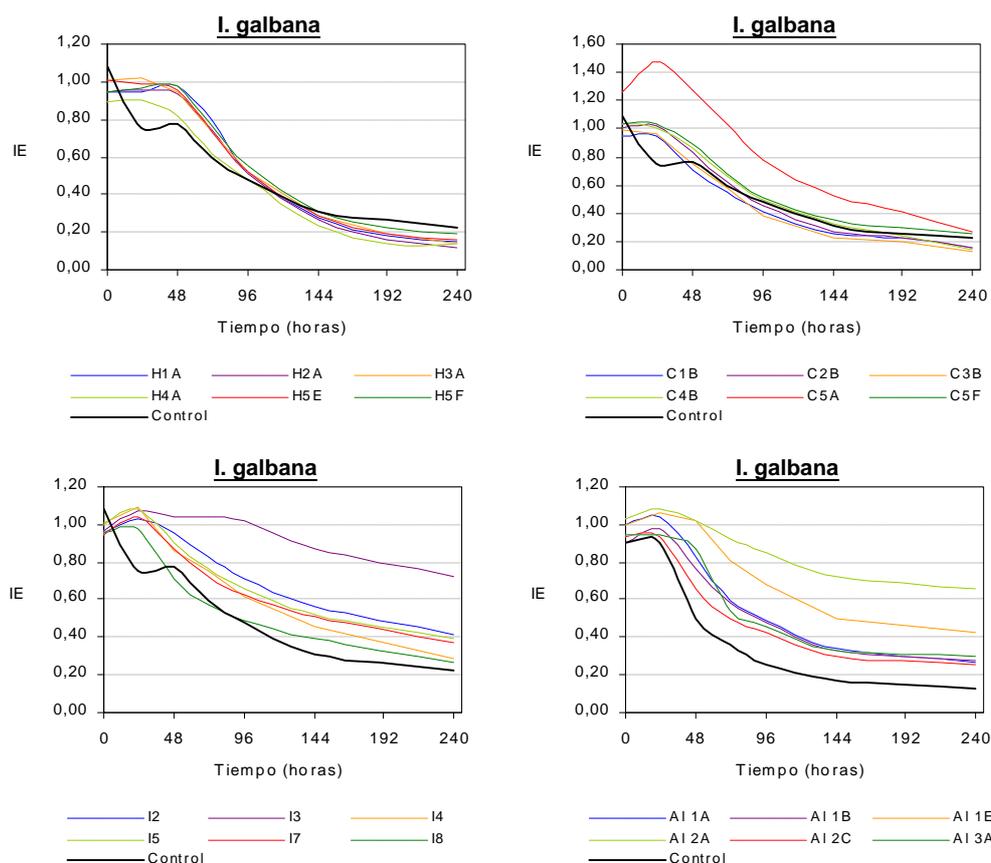


Figura C III.65. Variación temporal de los I_E de *I. galbana* en muestras ambientales de las áreas litorales de estudio

A partir de las gráficas mostradas en esta figura se observa que los comportamientos descritos para cada alga, dependen además del área litoral de estudio. En el caso de *I. galbana* el comportamiento mostrado por el alga en la Ría de Huelva y en Cádiz es similar. Por contra, la variación temporal de los I_E en el Río Iro y Bahía de Algeciras indican que el contenido en nutrientes de ambas áreas es decisivo en el cálculo de los I_E de las muestras ensayadas.

Hay que notar la situación superior de las curvas relativas a las muestras ambientales del Río Iro y Bahía de Algeciras, sobre la curva obtenida para los inóculos. Para un periodo de exposición concreto, la diferencia en los valores de los I_E de las muestras denotan una variabilidad espacial del índice de *I. galbana* en estas zonas litorales.

Finalmente, en función del análisis realizado y considerando el conjunto de casos estudiados puede decirse que el índice de eutrofización definido es un índice sensible que responde a la composición físico-química de las muestras ambientales. Las algas seleccionadas para el cálculo de estos índices muestran diversos comportamientos en función del área ambiental estudiada. Esta variabilidad hace que sea difícil seleccionar un único alga de ensayo para evaluar la calidad ambiental de las aguas naturales mediante criterios biológicos. Por ello, se define un I_E GLOBAL como el promedio de los índices obtenidos para cada una de las algas seleccionadas (Garrido *et al.*, 2000, 2001):

$$I_{E\text{ global}} = \frac{\sum I_{Ei}}{n}$$
, siendo "n" el número de algas considerados en el índice global, e "i" el alga considerada.

Los $I_{E \text{ global}}$ expresados en términos de porcentaje respecto al $I_{E \text{ límite}}$ se calcula de la siguiente forma:

$$\% I_E = \frac{I_E - I_{E \text{ LÍMITE}}}{I_{E \text{ LÍMITE}}} \times 100$$

Notar que esta expresión es similar a las definidas para la obtención de los porcentajes de inhibición y/o sobrecrecimiento tradicionales.

Puesto que el I_E de cada alga, y por tanto del $I_{E \text{ global}}$ presentan variabilidad temporal, el análisis de cada muestra ambiental se realizará en función de dos periodos de exposición 72 h (3 días) y 240 h (10 días).

4.2.2. ANÁLISIS DE LOS $I_{E \text{ GLOBAL}}$ DE CADA ÁREA LITORAL DE ESTUDIO

En los siguientes apartados se muestran y comentan los valores del $I_{E \text{ global}}$ obtenidos para cada muestra ambiental en ambos periodos de exposición.

Con el fin de corroborar la sensibilidad del ensayo a las concentraciones naturales de nutrientes, se han calculado las matrices de correlación de Pearson considerando los valores de los I_E de cada periodo de exposición de cada alga con la concentración de nutrientes medidas en el agua.

4.2.2.1. I_E EN LA RÍA DE HUELVA

Las siguientes tablas muestra los resultados obtenidos para esta área litoral.

Tabla C III.74. Índices de I_E e $I_{E \text{ global}}$ en la Ría de Huelva

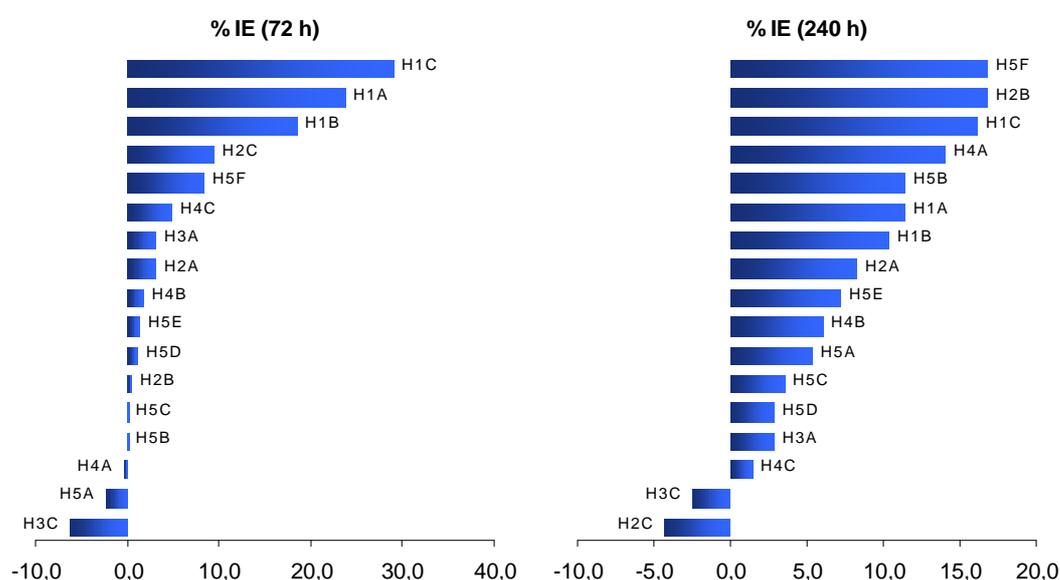
| I_E RÍA DE HUELVA (72 h) | | | | | | | $I_{E \text{ global}}$ RÍA DE HUELVA (240 h) | | | | | | |
|----------------------------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------------------------|--|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------------------------|
| 72 h | NG | IG | TC | TS | $I_{E \text{ global}}$ | % $I_{E \text{ global}}$ | 240 h | NG | IG | TC | TS | $I_{E \text{ global}}$ | % $I_{E \text{ global}}$ |
| Control | 0,978 | 0,772 | 0,693 | 0,513 | 0,739 | 0,0 | Control | 0,417 | 0,265 | 0,271 | 0,159 | 0,278 | 0,00 |
| H1A | 0,997 | 0,799 | 1,027 | 0,832 | 0,914 | 23,68 | H1A | 0,547 | 0,148 | 0,279 | 0,268 | 0,310 | 11,51 |
| H1B | 0,995 | 0,738 | 0,991 | 0,777 | 0,875 | 18,40 | H1B | 0,560 | 0,115 | 0,277 | 0,274 | 0,307 | 10,43 |
| H1C | 1,048 | 0,743 | 1,198 | 0,824 | 0,953 | 28,96 | H1C | 0,603 | 0,142 | 0,268 | 0,280 | 0,323 | 16,19 |
| H2A | 0,996 | 0,743 | 0,454 | 0,855 | 0,762 | 3,11 | H2A | 0,576 | 0,117 | 0,221 | 0,293 | 0,301 | 8,27 |
| H2B | 0,977 | 0,716 | 0,502 | 0,777 | 0,743 | 0,54 | H2B | 0,562 | 0,147 | 0,276 | 0,314 | 0,325 | 16,91 |
| H2C | 0,973 | 0,772 | 0,566 | 0,924 | 0,809 | 9,47 | H2C | 0,496 | 0,120 | 0,227 | 0,219 | 0,266 | -4,32 |
| H3A | 0,965 | 0,734 | 0,475 | 0,876 | 0,763 | 3,25 | H3A | 0,521 | 0,137 | 0,241 | 0,245 | 0,286 | 2,88 |
| H3C | 0,944 | 0,616 | 0,437 | 0,776 | 0,693 | -6,22 | H3C | 0,519 | 0,094 | 0,243 | 0,228 | 0,271 | -2,52 |
| H4A | 0,963 | 0,615 | 0,472 | 0,894 | 0,736 | -0,41 | H4A | 0,526 | 0,141 | 0,249 | 0,353 | 0,317 | 14,03 |
| H4B | 0,935 | 0,630 | 0,586 | 0,858 | 0,752 | 1,76 | H4B | 0,525 | 0,116 | 0,276 | 0,265 | 0,295 | 6,12 |
| H4C | 0,940 | 0,694 | 0,471 | 0,997 | 0,776 | 5,01 | H4C | 0,524 | 0,110 | 0,229 | 0,266 | 0,282 | 1,44 |
| H5A | 0,902 | 0,713 | 0,439 | 0,835 | 0,722 | -2,30 | H5A | 0,521 | 0,116 | 0,233 | 0,300 | 0,293 | 5,40 |
| H5B | 0,983 | 0,657 | 0,495 | 0,833 | 0,742 | 0,41 | H5B | 0,561 | 0,124 | 0,270 | 0,284 | 0,310 | 11,51 |
| H5C | 0,971 | 0,699 | 0,494 | 0,802 | 0,742 | 0,41 | H5C | 0,519 | 0,117 | 0,268 | 0,250 | 0,288 | 3,60 |
| H5D | 1,010 | 0,702 | 0,465 | 0,816 | 0,748 | 1,22 | H5D | 0,552 | 0,089 | 0,271 | 0,229 | 0,286 | 2,88 |
| H5E | 1,001 | 0,736 | 0,595 | 0,669 | 0,750 | 1,49 | H5E | 0,580 | 0,155 | 0,257 | 0,200 | 0,298 | 7,19 |
| H5F | 0,990 | 0,761 | 0,764 | 0,694 | 0,802 | 8,53 | H5F | 0,627 | 0,191 | 0,301 | 0,180 | 0,325 | 16,91 |

| Aumento del riesgo de eutrofización | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | H3C | H5A | H4A | H5B | H5C | H2B | H5D | H5E | H4B | H2A | H3A | H4C | H5F | H2C | H1B | H1A | H1C |
| 72 h | 0,693 | 0,722 | 0,736 | 0,742 | 0,742 | 0,743 | 0,748 | 0,750 | 0,752 | 0,762 | 0,763 | 0,776 | 0,802 | 0,809 | 0,875 | 0,914 | 0,953 |
| 240 h | H2C | H3C | H4C | H3A | H5D | H5C | H5A | H4B | H5E | H2A | H1B | H1A | H5B | H4A | H1C | H2B | H5F |
| | 0,266 | 0,271 | 0,282 | 0,286 | 0,286 | 0,288 | 0,293 | 0,295 | 0,298 | 0,301 | 0,307 | 0,310 | 0,310 | 0,317 | 0,323 | 0,325 | 0,325 |

Tabla C III.75. Matriz de correlación de Pearson –Nutrientes vs I_E. Ría de Huelva

| | 72 horas (3 días) | | | | | 240 horas (10 días) | | | | |
|-------------------|-------------------|---------------|---------------|---------------|----------------|---------------------|---------------|--------|--------|----------------|
| | NG | IG | TC | TP | I _E | NG | IG | TC | TP | I _E |
| N-NO ₂ | <u>0,494</u> | <u>0,614</u> | <u>0,644</u> | <u>-0,511</u> | <u>0,576</u> | <u>0,511</u> | 0,444 | 0,163 | -0,129 | 0,367 |
| N-NO ₃ | -0,068 | -0,067 | 0,323 | 0,111 | 0,281 | 0,172 | 0,144 | 0,178 | 0,200 | 0,304 |
| N-NH ₄ | 0,176 | 0,375 | 0,080 | -0,396 | 0,050 | 0,322 | 0,140 | -0,260 | -0,085 | 0,069 |
| SN | 0,056 | 0,152 | 0,338 | -0,119 | 0,287 | 0,314 | 0,208 | 0,039 | 0,114 | 0,299 |
| P-PO ₄ | 0,458 | <u>0,729</u> | <u>0,727</u> | <u>-0,541</u> | <u>0,655</u> | <u>0,642</u> | <u>0,605</u> | 0,310 | -0,224 | 0,474 |
| TC | -0,395 | <u>-0,636</u> | <u>-0,497</u> | 0,450 | -0,462 | <u>-0,499</u> | -0,342 | -0,045 | 0,291 | -0,195 |
| IC | -0,451 | <u>-0,654</u> | <u>-0,590</u> | <u>0,626</u> | <u>-0,502</u> | <u>-0,645</u> | <u>-0,628</u> | -0,266 | 0,387 | -0,373 |
| TOC | 0,078 | -0,006 | 0,141 | -0,295 | 0,045 | 0,237 | <u>0,504</u> | 0,403 | -0,158 | 0,315 |

Las correlaciones subrayadas son significantes para p< 0.05, N=17
 NG: *Nannochloropsis gaditana*; IG: *Isochrysis galbana*; TC: *Tetraselmis chuii*; TP: *Thalassiosira pseudonana*

Figura C III.66. Porcentajes de I_E respecto al I_E límite de ensayo. Ría de Huelva

En el apartado de análisis del índice ya se ha comentado la variabilidad de los resultados en función de la especie de ensayo. Por lo tanto, para no ser reiterativos en este aspecto, sólo se comentarán casos o comportamientos excepcionales observados en cada área ambiental de estudio. Los comentarios se centrarán en los I_E global calculados y en los % de I_E global respecto al I_E límite.

En la tabla adjunta se han mostrado los resultados obtenidos de cada I_E. Al objeto de visualizar mejor los resultados se han incluido dos representaciones: una tabla ordenada en función de los I_E obtenidos en cada periodo de exposición, y un diagrama de barras en el cual se representa de forma ordenada los porcentajes de riesgo de eutrofización. La parte alta de la figura muestra las estaciones con mayor riesgo de eutrofización mientras que la zona inferior incluye las estaciones que han presentado porcentajes de riesgo muy pequeños o incluso negativos. Los porcentajes negativos indican algún efecto "tóxico" de la matriz de ensayo sobre la población de algas. Este efecto "tóxico" podrá ser debido a la presencia de compuestos que ejercen toxicidad sobre la población y por tanto una reducción en la velocidad de crecimiento, o también puede ser producido por la limitación de algún nutriente esencial sobre el crecimiento de la población.

Las figuras son las que permiten visualizar de forma más clara los resultados obtenidos. La figura de la izquierda muestra los resultados a las 72 h de exposición, y la de la derecha, los resultados obtenidos en el periodo de exposición crónica de 240 horas o 10 días de duración.

A las 72 horas se observa como lo que se ha denominado "efecto umbral" de estos ensayos se manifiesta claramente en las estaciones pertenecientes al transecto H1. Recordando los resultados y el análisis de índices de calidad físico-químicos del Capítulo II, este transecto se identificó como el de mayor grado de alteración o contaminación de las aguas en relación al contenido en nutrientes. En ese mismo estudio, las estaciones correspondientes con los ríos Tinto y Odiel (H5E y H5F), se identificaron como las más contaminadas del sistema. Los resultados obtenidos en estos índices muestran un alto porcentaje de riesgo para la estación H5F, y en menor medida y en la zona central de la clasificación, la estación H5E. No hay que olvidar que este ensayo refleja dos tipos de respuestas: crecimiento producido por un contenido de nutrientes y ralentización del crecimiento producido por la presencia de compuestos de diversa naturaleza que ejercen un cierto efecto de toxicidad a la población. Ambos efectos se producen al mismo tiempo, y el predominante es el que se refleja en el resultado. La estación H5E además de ser de mayor contaminación en términos de nutrientes, está localizada en una zona donde convergen vertido de diferente naturaleza y en caudales importantes. Si el resultado del I_E obtenido en esta estación no está en consonancia con los resultados obtenidos en estaciones similares (p.e. H1A que es la más próxima), puede pensarse que en este punto los bajos porcentajes de riesgo de eutrofización se producen por un efecto de toxicidad del medio.

En el periodo de exposición crónico, cuando los nutrientes del medio deben haberse agotado, disminuyen considerablemente los potenciales de eutrofización estabilizándose en torno a un 15 % en la estación de mayor riesgo (H5F).

Respecto a la relación de estos ensayos con los niveles naturales de nutrientes, la matriz de correlación de Pearson computada con los resultados analíticos de diversos nutrientes (fundamentalmente formas de nitrógeno, fósforo y carbono disuelto), muestran buenas correlaciones entre los contenidos de nitritos, fosfatos y carbono inorgánico y el crecimiento de *I. galbana* y *T. chunii*. Para *T. pseudonana* se obtienen correlaciones significativas negativas con los nitritos, fosfatos y carbono inorgánico. A las 240 horas de exposición, las correlaciones no aparecen tan significativas, mostrando solamente buenos resultados para *N. gaditana*. Las correlaciones negativas en el crecimiento de *T. pseudonana* pueden significar un cierto nivel de toxicidad frente a las muestras ambientales. No hay que olvidar que este alga está catalogada como sensible para algunos autores. Además, las concentraciones más altas de nitritos se producen en las estaciones y transectos más interiores de la ría. En estas aguas próximas a los núcleos industriales y urbanos pueden estar presentes otros compuestos que afecten al crecimiento del alga.

4.2.2.2. I_E EN LA BAHÍA DE CÁDIZ

Los resultados obtenidos para las muestras obtenidas en la Bahía de Cádiz se muestran a continuación.

Tabla C III.76. Índices de I_E e I_{E global} en la Bahía de Cádiz

| I _E BAHÍA DE CÁDIZ (72 h) | | | | | | | Í _E BAHÍA DE CÁDIZ (240 h) | | | | | | |
|--------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|-------------------------|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|-------------------------|
| 72 h | NG | IG | TC | TS | I _{E global} | % I _{E global} | 240 h | NG | IG | TC | TS | I _{E global} | % I _{E global} |
| Control | 0,755 | 0,771 | 0,692 | 0,512 | 0,682 | 0,00 | Control | 0,451 | 0,260 | 0,275 | 0,284 | 0,150 | 0,00 |
| C1A | 1,062 | 0,514 | 0,502 | 0,675 | 0,688 | 0,88 | C1A | 0,483 | 0,116 | 0,143 | 0,404 | 0,286 | 90,67 |
| C1B | 1,086 | 0,552 | 0,345 | 0,953 | 0,734 | 7,62 | C1B | 0,626 | 0,161 | 0,141 | 0,310 | 0,310 | 106,67 |
| C1C | 1,085 | 0,628 | 0,534 | 0,901 | 0,787 | 15,40 | C1C | 0,526 | 0,146 | 0,127 | 0,151 | 0,237 | 58,00 |
| C1D | 1,028 | 0,604 | 0,575 | 0,789 | 0,749 | 9,82 | C1D | 0,606 | 0,092 | 0,147 | 0,160 | 0,251 | 67,33 |
| C2A | 1,067 | 0,579 | 0,445 | 0,924 | 0,754 | 10,56 | C2A | 0,522 | 0,106 | 0,120 | 0,208 | 0,239 | 59,33 |
| C2B | 1,003 | 0,619 | 0,435 | 0,897 | 0,738 | 8,21 | C2B | 0,648 | 0,163 | 0,148 | 0,327 | 0,322 | 114,67 |
| C2C | 1,043 | 0,723 | 0,470 | 0,831 | 0,767 | 12,46 | C2C | 0,597 | 0,119 | 0,129 | 0,228 | 0,268 | 78,67 |
| C3A | 1,066 | 0,718 | 0,430 | 0,802 | 0,754 | 10,56 | C3A | 0,488 | 0,213 | 0,131 | 0,268 | 0,275 | 83,33 |
| C3B | 1,057 | 0,578 | 0,511 | 0,925 | 0,768 | 12,61 | C3B | 0,505 | 0,125 | 0,148 | 0,259 | 0,259 | 72,67 |
| C3C | 1,045 | 0,670 | 0,490 | 0,967 | 0,793 | 16,28 | C3C | 0,526 | 0,203 | 0,130 | 0,273 | 0,283 | 88,67 |
| C4A | 1,056 | 0,653 | 0,474 | 0,830 | 0,753 | 10,41 | C4A | 0,467 | 0,190 | 0,125 | 0,266 | 0,262 | 74,67 |
| C4B | 1,139 | 0,667 | 0,559 | 0,764 | 0,783 | 14,81 | C4B | 0,497 | 0,143 | 0,127 | 0,123 | 0,222 | 48,00 |
| C5A | 1,126 | 1,038 | 0,653 | 0,988 | 0,951 | 39,44 | C5A | 0,639 | 0,271 | 0,155 | 0,330 | 0,349 | 132,67 |
| C5C | 1,058 | 0,594 | 0,550 | 0,842 | 0,761 | 11,58 | C5C | 0,453 | 0,084 | 0,128 | 0,151 | 0,204 | 36,00 |
| C5D | 1,049 | 0,606 | 0,470 | 0,821 | 0,737 | 8,06 | C5D | 0,465 | 0,144 | 0,129 | 0,165 | 0,226 | 50,67 |
| C5E | 1,070 | 0,745 | 0,419 | 0,879 | 0,778 | 14,08 | C5E | 0,549 | 0,234 | 0,159 | 0,243 | 0,296 | 97,33 |
| C5F | 2,425 | 0,680 | 0,416 | 0,653 | 1,044 | 53,08 | C5F | 0,848 | 0,250 | 0,217 | 0,248 | 0,391 | 160,67 |

Aumento del riesgo de eutrofización

| | C1A | C1B | C5D | C2B | C1D | C4A | C2A | C3A | C5C | C2C | C3B | C5E | C4B | C1C | C3C | C5A | C5F |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 72 h | 0,688 | 0,734 | 0,737 | 0,738 | 0,749 | 0,753 | 0,754 | 0,754 | 0,761 | 0,767 | 0,768 | 0,778 | 0,783 | 0,787 | 0,793 | 0,951 | 1,044 |
| 240 h | C5C | C4B | C5D | C1C | C2A | C1D | C3B | C4A | C2C | C3A | C3C | C1A | C5E | C1B | C2B | C5A | C5F |
| | 0,204 | 0,222 | 0,226 | 0,237 | 0,239 | 0,251 | 0,259 | 0,262 | 0,268 | 0,275 | 0,283 | 0,286 | 0,296 | 0,310 | 0,322 | 0,349 | 0,391 |

Tabla C III.77. Matriz de correlación de Pearson –Nutrientes vs I_E. Bahía de Cádiz

| | 72 horas (3 días) | | | | | 240 horas (10 días) | | | | |
|-------------------|-------------------|--------------|--------------|--------|----------------|---------------------|--------------|--------------|--------|----------------|
| | NG | IG | TC | TP | I _E | NG | IG | TC | TP | I _E |
| N-NO ₂ | 0,155 | 0,060 | 0,145 | -0,376 | 0,097 | -0,111 | 0,035 | -0,048 | -0,474 | -0,252 |
| N-NO ₃ | -0,130 | <u>0,860</u> | <u>0,530</u> | 0,364 | 0,380 | 0,145 | <u>0,527</u> | 0,154 | 0,258 | 0,368 |
| N-NH ₄ | 0,279 | <u>0,860</u> | <u>0,532</u> | 0,169 | <u>0,726</u> | 0,456 | <u>0,645</u> | 0,442 | 0,213 | <u>0,594</u> |
| SN | 0,010 | <u>0,894</u> | <u>0,560</u> | 0,284 | 0,512 | 0,241 | <u>0,586</u> | 0,249 | 0,215 | 0,434 |
| P-PO ₄ | <u>0,959</u> | 0,313 | -0,071 | -0,436 | <u>0,907</u> | <u>0,773</u> | <u>0,610</u> | <u>0,879</u> | -0,014 | <u>0,719</u> |
| TC | <u>0,614</u> | <u>0,559</u> | 0,065 | -0,216 | <u>0,744</u> | <u>0,571</u> | <u>0,691</u> | <u>0,679</u> | -0,042 | <u>0,596</u> |
| IC | <u>0,614</u> | <u>0,583</u> | 0,086 | -0,153 | <u>0,774</u> | <u>0,555</u> | <u>0,737</u> | <u>0,660</u> | -0,032 | <u>0,603</u> |
| TOC | <u>0,540</u> | 0,422 | -0,005 | -0,374 | <u>0,566</u> | <u>0,549</u> | 0,475 | <u>0,654</u> | -0,066 | 0,504 |

Las correlaciones subrayadas son significantes para p < 0,05, N=17

NG: *Nannochloropsis gaditana*; IG: *Isochrysis galbana*; TC: *Tetraselmis chuii*; TP: *Thalassiosira pseudonana*

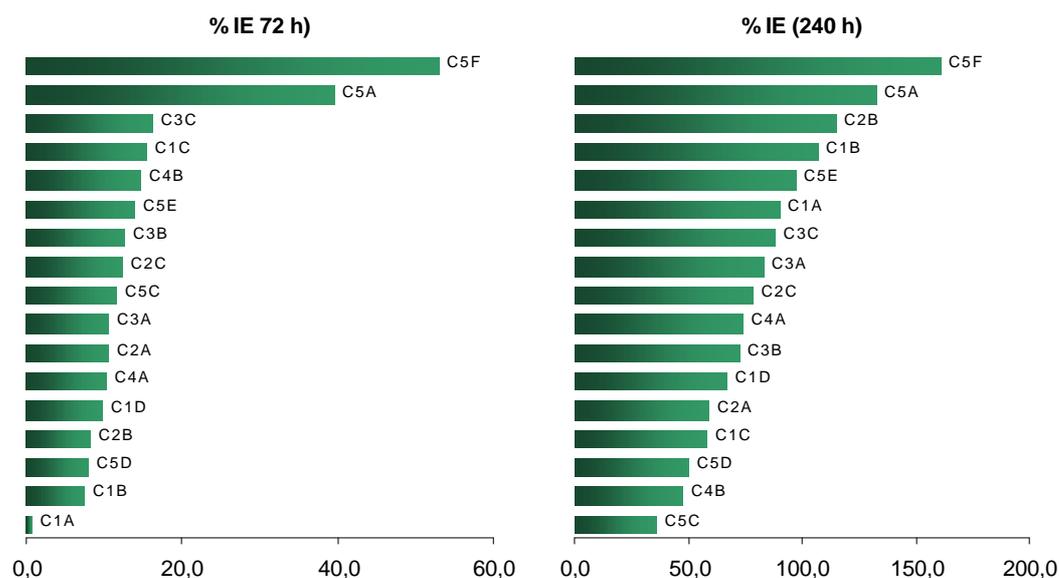


Figura C III.67. Porcentajes de IE respecto al IE límite de ensayo. Bahía de Cádiz

En la tabla anterior se muestran los resultados obtenidos para cada alga. Del conjunto de resultados hay que destacar los valores tan elevados de los índices de *N. gaditana* en la estación C5F en los dos periodos de exposición (2,425 a las 72 h y 0,848 a las 240 h). Los valores de este alga son los que condiciona el valor del índice de esta estación en ambos periodos.

Respecto a los valores obtenidos en ambos periodos de exposición, se observa como la respuestas a las 72 horas muestra una diferenciación bastante determinante entre las estaciones más interiores de la bahía (y de mayor concentración de nutrientes) del resto de estaciones. Estas estaciones vuelven a aparecer con un mayor riesgo de eutrofización en el periodo de exposición crónico.

La matriz de correlaciones indica correlaciones muy significativas entre el contenido de nutrientes de las muestras y el crecimiento de las algas tanto a las 72 como a las 240 horas de exposición. Destacar las obtenidas por el alga *N. gaditana* y los niveles de fosfatos. También son destacables las correlaciones con los nitratos y amonio en el crecimiento de las algas *I. galbana* y *T. chuii*. El alga *T. pseudonana* no presenta ninguna correlación significativa con el contenido de nutrientes de la Bahía de Cádiz.

4.2.2.3. IE EN EL RÍO IRO

Los resultados obtenidos para las muestras obtenidas en el Río Iro se muestran a continuación.

Tabla C III.78. Índices de I_E e I_{E global} en el Río Iro

| I _E RÍO IRO (72 h) | | | | | | | Í _E RÍO IRO (240 h) | | | | | | |
|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|-------------------------|--------------------------------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|-------------------------|
| 72 h | NG | IG | TC | TS | I _{E global} | % I _{E global} | 240 h | NG | IG | TC | TS | I _{E global} | % I _{E global} |
| Control | 0,978 | 0,771 | 0,513 | 0,512 | 0,694 | 0,00 | Control | 0,448 | 0,304 | 0,183 | 0,280 | 0,183 | 0,00 |
| I2 | 0,888 | 0,827 | 0,838 | 0,809 | 0,841 | 21,18 | I2 | 0,677 | 0,414 | 0,379 | 0,327 | 0,449 | 145,36 |
| I3 | 0,980 | 1,041 | 1,007 | 0,674 | 0,925 | 33,29 | I3 | 0,850 | 0,717 | 0,574 | 0,202 | 0,586 | 220,22 |
| I4 | 0,795 | 0,754 | 0,687 | 0,788 | 0,756 | 8,93 | I4 | 0,652 | 0,292 | 0,366 | 0,311 | 0,405 | 121,31 |
| I5 | 0,856 | 0,760 | 0,701 | 0,682 | 0,750 | 8,07 | I5 | 0,638 | 0,397 | 0,357 | 0,236 | 0,407 | 122,40 |
| I6 | 0,863 | 0,753 | 0,733 | 0,631 | 0,745 | 7,35 | I6 | 0,606 | 0,322 | 0,342 | 0,247 | 0,379 | 107,10 |
| I7 | 0,859 | 0,724 | 0,755 | 0,715 | 0,763 | 9,94 | I7 | 0,614 | 0,371 | 0,334 | 0,301 | 0,405 | 121,31 |
| I8 | 0,750 | 0,577 | 0,608 | 0,620 | 0,639 | -7,93 | I8 | 0,535 | 0,264 | 0,267 | 0,269 | 0,334 | 82,51 |

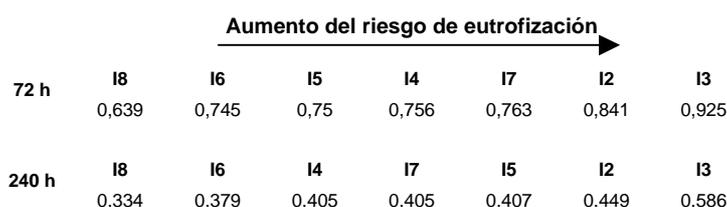


Tabla C III.79. Matriz de correlación de Pearson –Nutrientes vs I_E. Río Iro

| | 72 horas (3 días) | | | | | 240 horas (10 días) | | | | |
|-------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|----------------|---------------------|--------------|--------------|--------|----------------|
| | NG | IG | TC | TP | I _E | NG | IG | TC | TP | I _E |
| N-NO ₂ | 0,522 | 0,555 | 0,535 | <u>0,874</u> | 0,697 | 0,504 | 0,329 | 0,418 | 0,438 | 0,500 |
| N-NO ₃ | 0,528 | 0,460 | 0,521 | 0,709 | 0,622 | <u>0,410</u> | 0,330 | 0,341 | 0,422 | 0,445 |
| N-NH ₄ | 0,718 | <u>0,887</u> | <u>0,792</u> | 0,092 | <u>0,799</u> | <u>0,946</u> | <u>0,883</u> | <u>0,955</u> | -0,555 | <u>0,918</u> |
| SN | <u>0,817</u> | <u>0,909</u> | <u>0,869</u> | 0,450 | <u>0,929</u> | <u>0,926</u> | <u>0,835</u> | <u>0,895</u> | -0,188 | <u>0,924</u> |
| P-PO ₄ | 0,723 | <u>0,890</u> | <u>0,800</u> | 0,082 | <u>0,802</u> | <u>0,948</u> | <u>0,889</u> | <u>0,958</u> | -0,560 | <u>0,922</u> |
| TC | 0,606 | <u>0,815</u> | 0,667 | 0,515 | <u>0,789</u> | <u>0,804</u> | 0,579 | <u>0,771</u> | -0,126 | 0,736 |
| IC | 0,731 | <u>0,894</u> | 0,748 | 0,278 | <u>0,827</u> | <u>0,871</u> | 0,708 | <u>0,863</u> | -0,387 | <u>0,809</u> |
| TOC | 0,186 | 0,433 | 0,322 | <u>0,863</u> | 0,501 | 0,451 | 0,158 | 0,374 | 0,442 | 0,389 |

Las correlaciones subrayadas son significantes para p < 0.05, N=7

NG: *Nannochloropsis gaditana*; IG: *Isochrysis galbana*; TC: *Tetraselmis chuii*; TP: *Thalassiosira pseudonana*

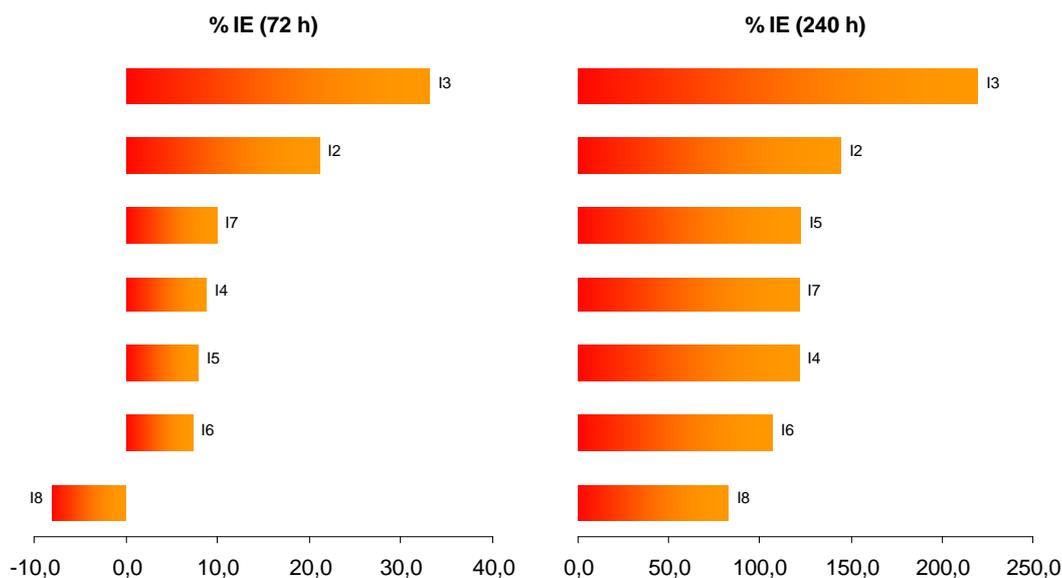


Figura C III.68. Porcentajes de I_E respecto al I_E límite de ensayo. Río Iro

Respecto a los índices en el Río Iro, las representaciones gráficas muestran como el riesgo de eutrofización se concentra en la estación próxima al punto de vertido de la EDAR "El Torno" (I3). La siguiente estación es I2 lo cual coincide con el análisis incluido en el Capítulo II en el cual se comentó que el efecto de la marea producía una concentración de la contaminación aguas arriba del vertido. Las siguientes estaciones que aparecen con mayor riesgo de eutrofización siguen la secuencia de estaciones aguas abajo del vertido. Sólo la estación I7 rompe esta secuencia lógica lo cual es posible puesto que esta estación se localiza en un punto de confluencia de canales del sistema de marismas los cuales conducen hacia el río vertidos procedentes de granjas de acuicultura. De cualquier forma, los valores del índice en I4 a I7 presentan valores muy parecidos y por tanto podría considerarse que el tramo longitudinal del río se comporta de la misma forma frente al índice I_E . La estación I8 localizada en el punto de mezcla del río con el caño de Sancti Petri presenta un índice de menor valor indicativa del proceso de mezcla con aguas de menor contenido en nutrientes como son las aguas del caño.

Una observación a destacar son los altos porcentajes de riesgo de eutrofización obtenidos en el periodo crónico de exposición incluso para la estación I8. No hay que olvidar que este río conduce continuamente el vertido de una EDAR por tanto es lógico que esta área sea la que presente los mayores valores del índice.

Respecto a la correlación de los niveles de nutrientes con el crecimiento de las algas se observa un gran número de correlaciones positivas siendo especialmente significativas para el alga *I. galbana*. De nuevo, *T. pseudonana* es el alga que presenta menor número de correlaciones significativas.

4.2.2.4. I_E EN LA BAHÍA DE ALGECIRAS

Los resultados obtenidos para las muestras obtenidas en la Bahía de Algeciras se muestran a continuación.

Tabla C III.80. Índices de I_E e $I_{E\text{ global}}$ en la Bahía de Algeciras

| I_E BAHÍA DE ALGECIRAS (72 h) | | | | | | | I_E BAHÍA DE ALGECIRAS (240 h) | | | | | | |
|---------------------------------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|-------------------------|----------------------------------|-------|-------|-------|-------|-----------------------|-------------------------|
| 72 h | NG | IG | TC | TS | $I_{E\text{ global}}$ | % $I_{E\text{ global}}$ | 240 h | NG | IG | TC | TS | $I_{E\text{ global}}$ | % $I_{E\text{ global}}$ |
| Control | 0,972 | 0,782 | 0,691 | 0,497 | 0,735 | 0,00 | Control | 0,446 | 0,303 | 0,323 | 0,168 | 0,310 | 0,00 |
| AI 1A | 0,943 | 0,590 | 0,531 | 0,363 | 0,607 | -17,41 | AI 1A | 0,490 | 0,270 | 0,218 | 0,112 | 0,272 | -12,26 |
| AI 1B | 0,916 | 0,588 | 0,542 | 0,340 | 0,596 | -18,91 | AI 1B | 0,484 | 0,274 | 0,236 | 0,104 | 0,275 | -11,29 |
| AI 1E | 0,972 | 0,805 | 0,804 | 0,559 | 0,785 | 6,80 | AI 1E | 0,635 | 0,423 | 0,399 | 0,259 | 0,429 | 38,39 |
| AI 2A | 1,006 | 0,920 | 0,660 | 0,513 | 0,775 | 5,44 | AI 2A | 0,835 | 0,661 | 0,351 | 0,211 | 0,515 | 66,13 |
| AI 2B | 0,897 | 0,520 | 0,525 | 0,334 | 0,569 | -22,59 | AI 2B | 0,448 | 0,225 | 0,239 | 0,095 | 0,252 | -18,71 |
| AI 2C | 1,066 | 0,496 | 0,517 | 0,395 | 0,618 | -15,92 | AI 2C | 0,460 | 0,251 | 0,219 | 0,127 | 0,264 | -14,84 |
| AI 3A | 0,899 | 0,545 | 0,522 | 0,338 | 0,576 | -21,63 | AI 3A | 0,423 | 0,296 | 0,205 | 0,104 | 0,257 | -17,10 |

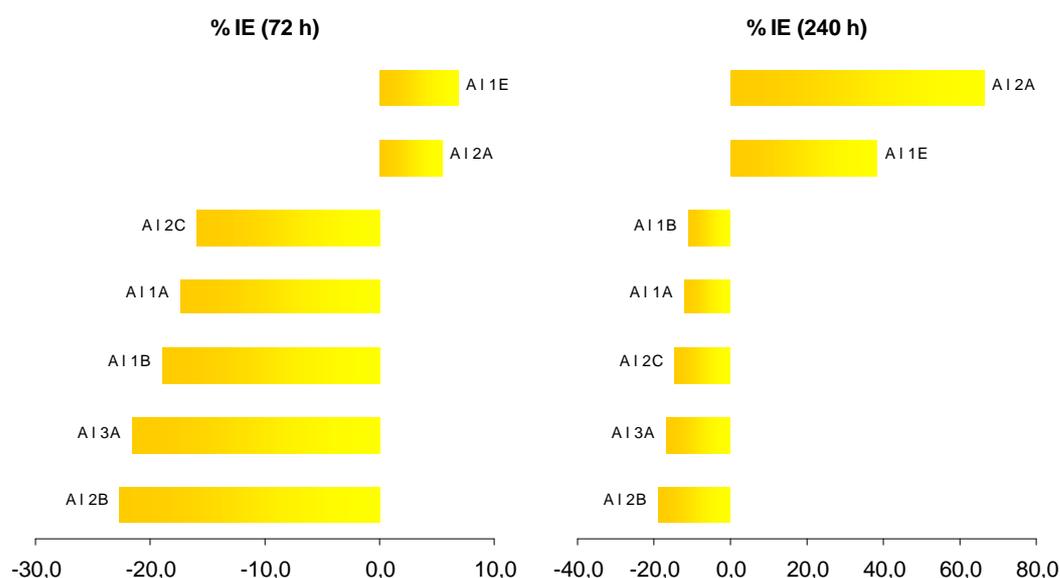
Aumento del riesgo de eutrofización →

| | | | | | | | |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 72 h | AI 2B | AI 3A | AI 1B | AI 1A | AI 2C | AI 2A | AI 1E |
| | 0,569 | 0,576 | 0,596 | 0,607 | 0,618 | 0,775 | 0,785 |
| 240 h | AI 2B | AI 3A | AI 2C | AI 1A | AI 1B | AI 1E | AI 2A |
| | 0,252 | 0,257 | 0,264 | 0,272 | 0,275 | 0,429 | 0,515 |

Tabla C III.81. Matriz de correlación de Pearson –Nutrientes vs I_E. Bahía de Algeciras

| | 72 horas (3 días) | | | | | 240 horas (10 días) | | | | |
|-------------------------|-------------------|--------------|--------------|--------------|----------------|---------------------|--------------|--------------|--------------|----------------|
| | NG | IG | TC | TP | I _E | NG | IG | TC | TP | I _E |
| N-NO₂ | 0,379 | <u>0,756</u> | 0,274 | 0,498 | 0,596 | <u>0,875</u> | <u>0,901</u> | 0,461 | 0,441 | <u>0,791</u> |
| N-NO₃ | 0,311 | <u>0,772</u> | 0,278 | 0,483 | 0,589 | <u>0,876</u> | <u>0,905</u> | 0,459 | 0,432 | <u>0,791</u> |
| N-NH₄ | 0,112 | 0,488 | <u>0,902</u> | 0,750 | 0,682 | 0,317 | 0,259 | <u>0,786</u> | <u>0,805</u> | 0,473 |
| SN | 0,342 | <u>0,981</u> | <u>0,885</u> | <u>0,943</u> | <u>0,977</u> | <u>0,941</u> | <u>0,923</u> | <u>0,947</u> | <u>0,940</u> | <u>0,987</u> |
| P-PO₄ | 0,109 | 0,466 | <u>0,891</u> | 0,738 | 0,666 | 0,295 | 0,238 | <u>0,772</u> | <u>0,793</u> | 0,453 |
| TC | 0,116 | 0,452 | <u>0,833</u> | 0,698 | 0,634 | 0,282 | 0,200 | 0,702 | 0,743 | 0,414 |
| IC | 0,267 | 0,486 | <u>0,760</u> | 0,705 | 0,654 | 0,348 | 0,271 | 0,636 | 0,727 | 0,449 |
| TOC | -0,152 | 0,297 | <u>0,771</u> | 0,535 | 0,462 | 0,114 | 0,049 | 0,658 | 0,608 | 0,271 |

Las correlaciones subrayadas son significantes para p < 0.05, N=7
 NG: *Nannochloropsis gaditana*; IG: *Isochrysis galbana*; TC: *Tetraselmis chuii*; TP: *Thalassiosira pseudonana*

Figura C III.69. Porcentajes de I_E respecto al I_E límite de ensayo. Bahía de Algeciras

Observando la figura se puede afirmar que el índice establece una clasificación de estaciones en dos grupos: estaciones próximas a puntos de vertido (AI2A y AI1E) y el resto de estaciones. Claramente se observa como son las estaciones AI 1E y AI 2A las que presentan un mayor riesgo de eutrofización presentando altos porcentajes de riesgo obtenidos para el periodo crónico de 240 h. El resto de estaciones de muestreo presentan porcentajes negativos en el riesgo de eutrofización. Ya se ha comentado en otras ocasiones que las aguas de la Bahía de Algeciras presentan un comportamiento distinto al resto de áreas litorales, comportamiento que se ha explicado en base a los resultados analíticos y a los ensayos de LAS y aguas receptoras en términos de una gran limitación por fósforo en las aguas. El índice de eutrofización identifica de nuevo este suceso. Hay que resaltar la importancia de este hecho puesto que en términos de nitrógeno, la Bahía de Algeciras presenta con diferencia, mayores niveles que Huelva y Cádiz, y por tanto y en función de este nutriente, podría pensarse que es el área ambiental que presenta mayor riesgo de eutrofización. Sólo en aquellas estaciones en las que se han obtenido concentraciones de fósforo por encima del límite de detección del método analítico, esto es, AI 1E y AI 2A se ha producido un porcentaje de riesgo de eutrofización positivo.

En relación con la correlación del crecimiento de las algas con los niveles de nutrientes, la tabla muestra gran número de correlaciones muy significativas para el alga *T. chuii* y en menor grado para *N. gaditana*, *I. galbana* y *T. pseudonana*.

4.2.2.5. I_E EN EL GOLFO DE CÁDIZ

Se han visto los resultados de los índices en cada una de las áreas litorales de estudio. En las áreas en las que se ha ensayado un gran número de estaciones, el ordenamiento de estaciones en función del riesgo de eutrofización no permite ver una clasificación una zonificación clara. Esto ocurre en la Ría de Huelva y la Bahía de Cádiz. Con los índices de calidad físico-químicos se producía una situación parecida que se solventó calculando los índices para el promedio de la concentración de los nutrientes de las estaciones de un mismo transecto. Para los ensayos realizados con aguas receptoras no es conveniente promediar para obtener el valor representativo del transecto puesto que estos ensayos reflejan la composición química completa de la muestra, y no sólo un conjunto de parámetros físico-químicos de análisis fácil en el laboratorio.

Si bien a priori puede parecer más complicado analizar todo el conjunto de estaciones a las cuales se les ha realizado este ensayo en el Golfo de Cádiz, si representamos los resultados en diagramas de barras e identificamos las zona ambientales con criterios de colores, se puede visualizar el comportamiento global de cada área litoral respecto al porcentaje de riesgo de eutrofización.

La siguiente figura muestra los resultados.

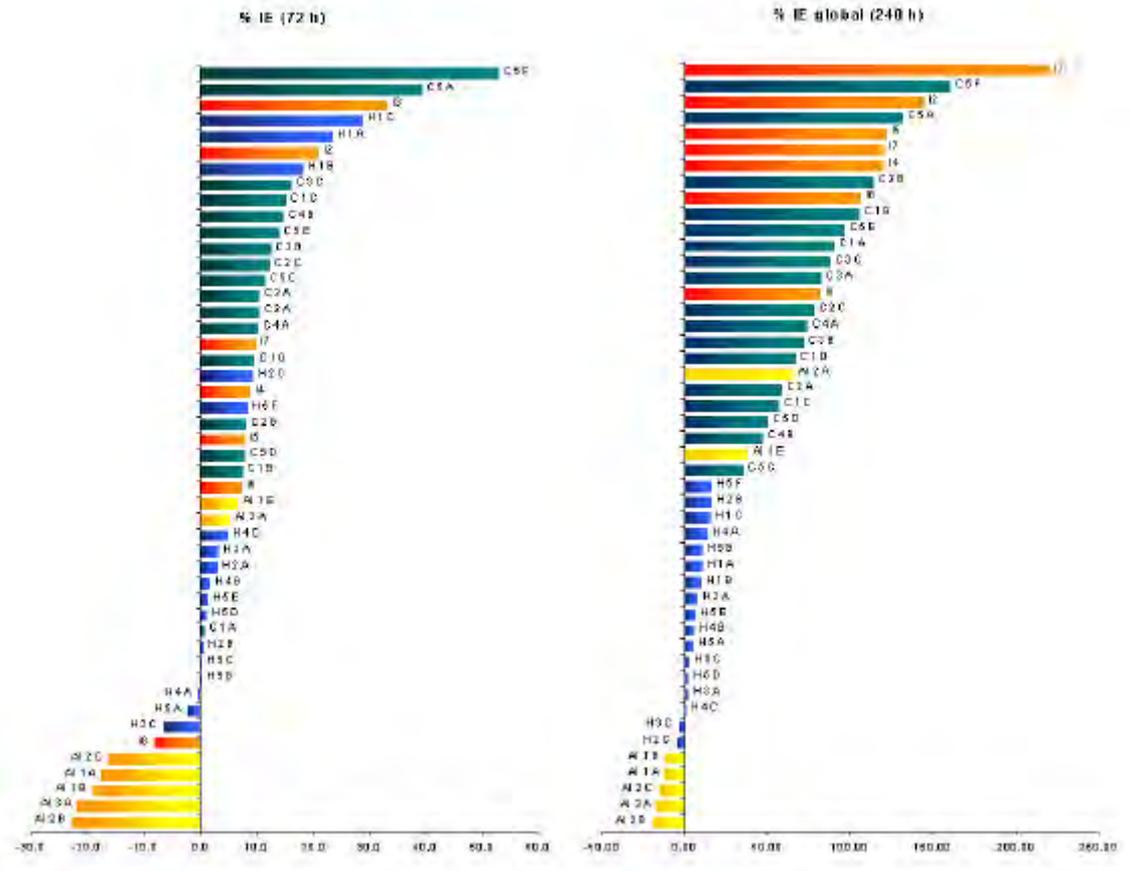


Figura C III.70. Porcentajes de I_E respecto al I_E límite de ensayo. Golfo de Cádiz

El índice a las 72 horas de exposición muestra resultados bastante concluyentes respecto a los porcentajes de riesgo de eutrofización. La estación que presenta un mayor porcentaje es la estación C5F, diferenciándose claramente de la segunda estación, C5A, y ésta de las estaciones I3, H1C, H1A, I2 y

H1B. Como se puede observar, estas estaciones son las que siempre se han identificado como estaciones con un alto grado de contaminación.

Después de este grupo superior de estaciones, se localiza un grupo heterogéneo de estaciones procedentes de diversas áreas ambientales, fundamentalmente pertenecientes a la Bahía de Cádiz y al Río Iro. Finalizando este grupo, se localizan las estaciones AI2A y AI1E, identificadas en la Bahía de Algeciras como las más problemáticas en términos de este índice. Seguidamente se agrupan las estaciones de Huelva.

En la parte baja de la gráfica, destacar la presencia de todas las estaciones de la Bahía de Algeciras exceptuando las anteriormente nombradas.

Para el periodo de exposición crónico, las estaciones que presentan un mayor riesgo son las que tienen mayor contenido en nutrientes. I3 presenta unos porcentajes desmesurados con respecto al resto de las estaciones. Le sigue C5F con porcentajes también muy importantes. I2 y C5A presentan valores muy parecidos. Le siguen de forma escalonada un gran número de estaciones, primero las correspondientes al Río Iro, estaciones de la Bahía de Cádiz, en posiciones intermedias a las de Cádiz las estaciones AI 2A y AI1E de Algeciras, las estaciones de Huelva se agrupan en bloque, y finalmente y con valores negativos las estaciones de Algeciras.

En relación a esta escala de áreas ambientales, es preciso hacer un comentario referente a los resultados obtenidos en Cádiz y Huelva. Los resultados físico-químicos obtenidos en ambas zonas se encuentran en los mismos órdenes de magnitud, siendo superiores en general en la Ría de Huelva. Los índices de calidad físico-químicos, el análisis estadístico de ambas áreas, y el diseño de valores guía de calidad ambiental que se verán posteriormente en el *Capítulo IV* apuntan a que los resultados obtenidos en esta área deberían ser del mismo orden o superiores a los obtenidos en Cádiz. Para encontrar una justificación a estos resultados hay que pensar que la Ría de Huelva está fuertemente industrializada frente al bajo-medio grado de industrialización de la Bahía de Cádiz. Durante los muestreos se ha observado que la calidad y apariencia de las aguas en Huelva es muy inferior a la que muestra la Bahía de Cádiz. Por tanto hay que pensar que si bien en términos de nutrientes no difieren en gran magnitud, si lo hacen en los vertidos que inciden en las aguas. Por tanto, los porcentajes más bajos en la ría hace pensar que se deban a un cierto efecto tóxico de la composición de las aguas sobre la población de microalgas.

4.2.3. CONCLUSIONES OBTENIDAS A PARTIR DE ESTOS ESTUDIOS

Una vez se han mostrado y comentado los resultados se obtienen las siguientes conclusiones relativas a estos ensayos:

- I. Se ha diseñado un procedimiento para ensayar la calidad global del medio receptor basado en el procedimiento de aguas receptoras descrito por la USEPA (Lewis *et al.*, 1994). Este ensayo se ha realizado en dos condiciones diferentes de nutrientes: condiciones naturales (limitación de nutrientes) y adicionando medio nutriente (condiciones sobresaturadas de nutrientes). Este procedimiento se ha ensayado con cuatro especies de algas diferentes. Se han observado y comentado los resultados obtenidos en dos periodos de exposición: 72 y 240 horas.
- II. Se ha definido un índice de eutrofización como la relación entre la biomasa obtenida en el ensayo con limitaciones nutritivas y el ensayo en condiciones no limitantes. Se ha definido una expresión para calcular el porcentaje de riesgo de eutrofización de cada muestra ambiental.
- III. Los resultados muestran que el ensayo es sensible a las condiciones nutritivas del medio.
- IV. Para que se obtengan altos porcentajes de eutrofización es necesario que se den tres condiciones: alta concentración de nutrientes, presencia de todos los nutrientes esenciales, y no presencia de compuestos en las aguas que produzcan toxicidad.

- V. Los resultados globales muestran que las estaciones caracterizadas como las más contaminadas desde un punto de vista físico-químico presentan un alto riesgo de eutrofización en función de este índice biológico.
- VI. Los resultados apuntan a una gran limitación de fósforo en la Bahía de Algeciras.
- VII. Las áreas que presentan mayor riesgo en escala descendente son: Río Iro, Bahía de Cádiz-Ría de Huelva y finalmente Bahía de Algeciras.

5. CONCLUSIONES Y CONSIDERACIONES

A lo largo de los diferentes apartados correspondientes a los dos estudios principales realizados en este *Capítulo III*, se han ido aportando los comentarios y conclusiones más relevantes obtenidos.

El objetivo de este apartado es realizar unas consideraciones finales acerca de las herramientas utilizadas en estos estudios y resumir brevemente las conclusiones obtenidas en cada apartado.

5.1. CONCLUSIONES RELATIVAS A LOS ENSAYOS DE COMPUESTOS ESPECÍFICOS

En apartados anteriores se han mostrado y comentado los resultados de toxicidad de siete compuestos específicos en tres taxones diferentes. En este apartado se sintetizan las conclusiones globales obtenidas en estos ensayos.

ENSAYOS CON ALGAS

- I. Se han seleccionado un amplio conjunto de microalgas marinas presentes en el litoral andaluz para realizar ensayos de toxicidad. Los resultados han demostrado que estas algas presentan diferentes sensibilidades a los tóxicos y por tanto nos permiten obtener un amplio conjunto de resultados de toxicidad para este taxón.
- II. Para estas algas se ha diseñado un protocolo de ensayo de compuestos específicos basado en los tradicionales ensayos de toxicidad con especies de agua dulce. Los resultados obtenidos en estos ensayos demuestran que el protocolo es versátil para compuestos de diversa naturaleza.
- III. Para el análisis de resultados se ha utilizado un nuevo parámetro denominado *biomasa normalizada* el cual nos permite observar mejor el comportamiento de la población a lo largo del ensayo, fundamentalmente en lo referente a la muerte de la población.
- IV. La biomasa normalizada representa el crecimiento neto de la población, por tanto, para una misma alga sería posible comparar curvas de crecimiento de ensayos diferentes (estudios de repetitividad del ensayo).
- V. Se han aplicado, técnicas de contraste de hipótesis al objeto de evaluar la calidad de los resultados.
- VI. Se han obtenido efectos umbrales basados en consideraciones estadísticas. De los dos niveles umbrales obtenidos, el más significativo es la NOEC.
- VII. La obtención de los umbrales de toxicidad están muy condicionados con el diseño experimental, fundamentalmente en lo relativo a concentraciones de ensayo y tiempo de exposición.
- VIII. Se han obtenido diferentes IC_p para la evaluación de la inhibición parcial de la población. Del conjunto obtenido, IC₂₅, IC₅₀ y IC₇₅ son las expresiones de toxicidad más sólidas. El nivel de toxicidad que representa IC₅ suelen contradecirse con la NOEC estadística y el que representa IC₉₅ suele contradecirse con concentraciones alquicidas experimentales.
- IX. Se ha propuesto un procedimiento para el estudio del nivel alquístico/alquicida, y se han obtenido resultados para varios compuestos.
- X. Se ha realizado una clasificación de compuestos en relación a la LC₅₀ (72 h). El orden en sentido decreciente de toxicidad es el siguiente: cadmio (II), cobre (II), LAS, lindano, NP9EO, zinc (II) y fenol.

- XI. Los diferentes comportamientos mostrados por cada alga frente a los tóxicos no permiten seleccionar un único alga como especie más sensible y representativa para realizar ensayos de toxicidad con compuestos químicos. Si bien, la clasificación realizada en función de las LC_{50} (72 h) permiten afirmar que el alga *Chaetoceros gracilis* ha sido la que ha presentado una mayor sensibilidad a los tóxicos. Por orden decreciente de sensibilidad se clasifican el resto de algas de la siguiente forma: *Nannochloropsis gaditana*, *Isochrysis galbana*, *Tetraselmis chuii* y *Dunaliella salina*.
- XII. Se ha estudiado el efecto de la matriz de ensayo en los ensayos de toxicidad de microalgas utilizando como agua de dilución, agua procedente de las zonas de estudio. Para ello se ha propuesto una metodología consistente en la realización de forma paralela de dos ensayos de toxicidad para cada compuesto específico: (I) Ensayo con un aporte adicional de nutrientes (medio f/2), y (II) Ensayo en las condicionales nutritivas reales de las áreas de estudio.
- XIII. Los resultados obtenidos en los ensayos con aporte de nutrientes reflejan un déficit de micronutrientes en el medio nutriente artificial que produce una sobrestimación de la toxicidad de los compuestos en los ensayos de toxicidad estándar.
- XIV. En los ensayos realizados en condiciones reales, las algas están sometidas a dos fuentes de estrés: nutrientes y tóxicos. Estos ensayos son más reales, por tanto, se propone la realización de este tipo de ensayos para los estudios de toxicidad de compuestos y de evaluación de riesgo ambiental.
- XV. Como conclusión global puede afirmarse que la toxicidad de un compuesto sobre las microalgas marinas es función de los siguientes factores: la especie biológica, el tiempo de exposición, las condiciones nutritivas y la matriz de ensayo.

ENSAYOS CON CRUSTÁCEOS

- XVI. Se ha diseñado un protocolo de ensayo de compuestos específicos para *Artemia* basado en los tradicionales ensayos de toxicidad con crustáceos.
- XVII. Se ha aplicado el método Probit para la obtención de la concentración del compuesto que define diferentes porcentajes de mortalidad, LC_p .
- XVIII. Los resultados de las diferentes LC_p permiten afirmar que las concentraciones obtenidas para porcentajes de mortalidad superiores al 50% no son buenos estimadores de toxicidad puesto que generalmente están referidas a concentraciones superiores al rango experimental y presentan intervalos de confianza muy elevados.
- XIX. La disponibilidad, fácil manipulación y eclosión de quistes de *Artemia*, además de los resultados obtenidos perfectamente comparables con datos toxicológicos de otros organismos, permiten proponer a estos organismos como organismos de referencia para ensayos de toxicidad en agua de mar.

ENSAYOS CON BACTERIAS MARINAS

- XX. Si bien el ensayo de bacterias luminiscentes está muy extendido hoy en día en diferentes campos de investigación, no se han obtenido resultados satisfactorios en todos los ensayos realizados. Por ello, es conveniente realizar más estudios acerca de la toxicidad de los compuestos ensayados y la aplicación de los resultados en el desarrollo de estándares de calidad ambiental.

5.2. CONCLUSIONES OBTENIDAS DE LOS ENSAYOS DE AGUAS RECEPTORAS

Una vez se han mostrado y comentado los resultados se obtienen las siguientes conclusiones relativas a estos ensayos:

- XXI. Se ha diseñado un procedimiento para ensayar la calidad global del medio receptor basado en el procedimiento de aguas receptoras descrito por la USEPA (Lewis *et al.*, 1994). Este ensayo se ha realizado en dos condiciones diferentes de nutrientes: condiciones naturales (limitación de nutrientes) y adicionando un medio nutriente sintético (condiciones sobresaturadas de nutrientes). Este procedimiento se ha ensayado con cuatro especies de algas diferentes.
- XXII. Se ha definido un índice de eutrofización como la relación entre la biomasa obtenida en el ensayo con limitaciones nutritivas y el ensayo en condiciones no limitantes. Se ha definido una expresión para calcular el porcentaje de riesgo de eutrofización de cada muestra ambiental.
- XXIII. Los resultados muestran que el ensayo es sensible a las condiciones nutritivas del medio.
- XXIV. Para que se obtengan altos porcentajes de eutrofización es necesario que se den tres condiciones: alta concentración de nutrientes, presencia de todos los nutrientes esenciales, y no presencia de compuestos en las aguas que produzcan toxicidad.
- XXV. Los resultados globales muestran que las estaciones caracterizadas como las más contaminadas desde un punto de vista físico-químico presentan un alto riesgo de eutrofización.
- XXVI. Los resultados apuntan a una gran limitación de fósforo en la Bahía de Algeciras.
- XXVII. Las áreas que presentan mayor riesgo en escala descendente son: río Iro, Bahía de Cádiz-ría de Huelva y finalmente Bahía de Algeciras.

CAPÍTULO IV

DETERMINACIÓN DE CRITERIOS DE CALIDAD AMBIENTAL

Resumen

En este capítulo se exponen la metodología utilizada para el desarrollo de valores guía de calidad ambiental de las variables fisicoquímicas tradicionales de control de aguas en cada una de las áreas litorales estudiadas, y las normas de calidad ambiental de compuestos específicos.

Finalmente se exponen conclusiones globales relativas al trabajo de investigación realizado.

Objetivos

Los objetivos que se pretenden cumplir con la elaboración de este capítulo son los siguientes:

- Desarrollar criterios de calidad ambiental en base a:
 - Niveles de fondo de los parámetros tradicionales de control de aguas de mar
 - Estándares de calidad ambiental de los compuestos específicos contemplados en este trabajo de investigación
- En base a los criterios de calidad ambiental desarrollados, analizar la viabilidad de los actuales objetivos de calidad de las aguas del litoral andaluz (Orden 14.02.1997, BOJA 1997).

INDICE DEL CAPÍTULO IV

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 2. ANTECEDENTES | 2 |
| 2.1. REVISIÓN DE LOS PRINCIPALES ENSAYOS PARA EL DESARROLLO DE CRITERIOS Y VALORES GUÍA DE CALIDAD EN AGUA | 2 |
| 2.1.1. PROCEDIMIENTO DE LA UNIÓN EUROPEA PARA EL ESTABLECIMIENTO DE ESTÁNDARES DE CALIDAD AMBIENTAL DE COMPUESTOS QUÍMICOS..... | 3 |
| 2.1.2. ENSAYO DEL CONSEJO DE MINISTROS DE MEDIO AMBIENTE DE CANADÁ | 3 |
| 2.1.3. ENSAYO DEL MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y ENERGÍA DE ONTARIO. | 4 |
| 2.1.4. ENSAYO DE LA AGENCIA DE PROTECCIÓN DEL MEDIO AMBIENTE DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA | 5 |
| 2.1.5. ENSAYO DEL MINISTERIO DE MEDIOAMBIENTE DE BRITISH COLUMBIA PARA ZONAS ESPECÍFICAS | 8 |
| 2.1.6. PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA PARA LA EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL DE SUSTANCIAS NUEVAS Y EXISTENTES..... | 9 |
| 2.1.7. APROXIMACIÓN A LOS NIVELES DE FONDO DE LOS COMPUESTOS EN AGUAS..... | 10 |
| 3. MATERIAL Y MÉTODOS..... | 11 |
| 3.1. DETERMINACIÓN DE VALORES GUÍA DE CALIDAD AMBIENTAL DE LAS VARIABLES FÍSICO-QUÍMICAS | 11 |
| 3.1.1. PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO DE LOS CRITERIOS DE CALIDAD | 11 |
| 3.2. PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE UN CRITERIOS DE CALIDAD AMBIENTAL DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS DE ESTUDIO..... | 15 |
| 3.2.1. CONSIDERACIONES PREVIAS | 15 |
| 3.2.2. PROCEDIMIENTO PARA EL DESARROLLO DE CRITERIOS DE CALIDAD AMBIENTAL DE COMPUESTOS ESPECÍFICOS | 17 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 23 |
| 4.1. VALORES GUÍA DE CALIDAD AMBIENTAL DE LAS VARIABLES FÍSICO-QUÍMICAS | 23 |
| 4.1.1. NITRÓGENO-AMONIO | 23 |
| 4.1.2. NITRÓGENO-NITRITO..... | 26 |
| 4.1.3. NITRÓGENO-NITRATO | 27 |
| 4.1.4. NITRÓGENO DISUELTO | 28 |
| 4.1.5. FÓSFORO-FOSFATO..... | 29 |
| 4.1.6. FÓSFORO | 31 |
| 4.1.7. SÍLICE-SILICATOS..... | 32 |
| 4.1.8. CARBONO ORGÁNICO | 33 |
| 4.2. VALORES GUÍA DE CALIDAD AMBIENTAL OBTENIDOS A PARTIR DE DATOS ECOTOXICOLÓGICOS ... | 35 |
| 4.2.1. RESULTADOS COMPARADOS DE LOS VALORES GUÍA I, II Y III..... | 36 |
| 4.2.2. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES GUÍA I Y II CON CONCENTRACIONES MEDIDAS EN EL AGUA Y OBJETIVOS DE CALIDAD | 37 |
| 4.2.3. EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS..... | 39 |
| 5. CONCLUSIONES GLOBALES..... | 40 |

1. INTRODUCCIÓN

Este último capítulo, es el capítulo central de la presente tesis doctoral puesto que en éste, se elaboran criterios de calidad ambiental utilizando los resultados, comentarios y conclusiones obtenidos en los capítulos previos.

En la introducción de este documento, se comentó que actualmente la estrategia que sigue la Unión Europea para el control de la contaminación de las aguas se fundamenta en un planteamiento combinado basado en el establecimiento de límites de vertidos y objetivos de calidad del medio receptor. Los objetivos de calidad que se definen en las diferentes normativas, no son más que criterios de calidad ambiental traducidos a una norma y con un carácter restrictivo.

Si bien la Directiva Marco de Aguas establece las pautas de actuación para los próximos años al objeto de desarrollar estos criterios de calidad ambiental, es preciso tener una visión de los diferentes procedimientos que desde hace años utilizan diversas organizaciones internacionales u organismos gubernamentales dedicados a tal fin. En el siguiente apartado se hará una breve descripción de los criterios y datos que utilizan. Estas organizaciones tienen una dilatada experiencia en el desarrollo y ejecución de estas metodologías y pueden ayudar a la toma de decisión en algunos pasos del procedimiento, como se verá en los próximos apartados.

Una observación interesante que se puede comprobar en esta revisión y que es de acuerdo con las premisas del presente trabajo, es que las agencias u organismos medioambientales, incluyendo la Unión Europea, cada vez abogan más por desarrollar criterios de calidad ambiental y planes de vigilancia de estos criterios en base a las particularidades de cada cuerpo de agua. Dentro de éstas peculiaridades se consideran en el mismo nivel de importancia, la composición química de las aguas naturales y las comunidades biológicas que viven en ella.

Antes de comenzar con el desarrollo del capítulo, es necesario realizar una puntualización sobre el trabajo previo realizado. En los *Capítulos II y III* se han aplicado un número considerable de técnicas de análisis de datos y se ha obtenido un gran conjunto de resultados de cada ensayo. En este capítulo sólo se utilizará un porcentaje reducido de éstos. No quiere decir esto que el resto de valores no sean útiles. Son indispensables para comprender los funcionamientos de los sistemas acuáticos (*Capítulo II*) y las relaciones dosis-respuesta de los diferentes contaminantes potenciales de las aguas sobre los organismos acuáticos (*Capítulo III*). Respecto a estas últimas, el conjunto de datos permite determinar si la concentración o concentraciones de toxicidad específica (generalmente NOEC y/o LC₅₀) que se van a utilizar en el desarrollo del criterio ambiental es correcta y refleja coherentemente la toxicidad del compuesto

2. ANTECEDENTES

2.1. REVISIÓN DE LOS PRINCIPALES ENSAYOS PARA EL DESARROLLO DE CRITERIOS Y VALORES GUÍA DE CALIDAD EN AGUA

Hoy en día no existe un procedimiento estándar que utilicen las diferentes agencias medioambientales u organizaciones supranacionales para determinar criterios o estándares de calidad ambiental. La mayoría de los procedimientos que actualmente se utilizan se han diseñado usando variaciones de los ensayos teóricos de toxicidad. Como cada una de las agencias adopta un procedimiento propio, es virtualmente imposible revisar todos los protocolos. En este apartado se resumen los procedimientos más representativos que se han encontrado en la literatura científica. Como se podrá observar en las siguientes páginas, la mayoría de ellos pertenecen a las agencias medioambientales de los EEUU y de Canadá. Estos dos países han sido pioneros en el desarrollo de estos procedimientos y, tal como se podrá comprobar, los fundamentos sobre los que se basan están muy elaborados y contrastados y han servido de base para el desarrollo de procedimientos a lo largo del mundo (ANZECC: Australian and New Zealand Environment and Conservation Council, 1993; DWAF: Department of Water Affairs and Forestry - South Africa-, 1993).

Los siguientes apartados resumen los procedimientos más significativos relacionados con los objetivos de este estudio. Estos procedimientos son los siguientes:

PROCEDIMIENTOS BASADOS EN RESULTADOS ECOTOXICOLÓGICOS

Procedimientos para la protección de la vida acuática:

- i) Procedimiento de la Unión Europea a través de la Directiva Marco de Aguas.
- ii) Ensayo del Consejo de Ministros de Medio Ambiente de Canadá;
- iii) Ensayo del Ministerio de Medio Ambiente de Ontario;
- iv) Ensayo de la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos de América (USEPA)

Procedimientos para la protección de la vida acuática en zonas específicas:

- v) Ensayo del Ministerio de Medio Ambiente de British Columbia;
- vi) Ensayo de recalculación de la USEPA
- vii) Ensayo de especies indicadoras de la USEPA
- viii) Ensayo de especies residentes de la USEPA

EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL DE SUSTANCIAS NUEVAS Y EXISTENTES

Procedimiento de evaluación ecotoxicológica

PROCEDIMIENTOS BASADOS EN RESULTADOS ANALÍTICOS TRADICIONALES

Determinación de criterios de calidad en aguas a partir de los niveles de fondo

2.1.1. PROCEDIMIENTO DE LA UNIÓN EUROPEA PARA EL ESTABLECIMIENTO DE ESTÁNDARES DE CALIDAD AMBIENTAL DE COMPUESTOS QUÍMICOS

La Unión Europea a través de la Directiva 60/2000/CE Marco de Aguas, ha desarrollado las pautas que deben seguir los Estados miembros para el establecimiento de las normas de calidad química de los contaminantes con el fin de proteger la biota acuática. Para el desarrollo de estas normas, las pautas a seguir son las siguientes:

Si es posible, deberán obtenerse datos, tanto puntuales como correspondientes a un período prolongado en el tiempo, respecto de los taxones que se mencionan a continuación y que sean pertinentes para el tipo de masa de agua afectada, así como de otros taxones acuáticos de cuyos datos se disponga. El "conjunto de base" de taxones lo componen:

- Algas y/o macrófitas;
- Daphnia u organismos representativos de las aguas saladas;
- Peces

Para el establecimiento de la concentración media anual máxima se aplicará el siguiente procedimiento:

- i) Los Estados miembros determinarán, en cada caso, factores de seguridad adecuados en consonancia con la naturaleza y calidad de los datos disponibles, con las indicaciones recogidas en la sección 3.3.1 de la Parte II del "Documento técnico de orientación en apoyo de la Directiva 93/67/CEE de la Comisión sobre la evaluación del riesgo de las nuevas sustancias notificadas y del Reglamento (CE) nº 1488/94 de la Comisión sobre la evaluación del riesgo de las sustancias existentes" y con los factores de seguridad establecidos en el siguiente cuadro:

| | Factor de seguridad |
|---|----------------------------|
| Al menos un L(E)C50 puntual de cada uno de los tres niveles tróficos del conjunto de base | 1000 |
| Un NOEC prolongado (peces o Daphnia o un organismo representativo de las aguas saladas) | 100 |
| Dos NOEC prolongados de especies que representen dos niveles tróficos (peces y/o Daphnia o un organismo representativo de las aguas saladas y/o algas) | 50 |
| NOEC prolongado de, al menos, tres especies (normalmente fauna ictiológica, Daphnia o un organismo representativo de las aguas saladas y algas) que representen tres niveles tróficos | 10 |
| Otros casos, incluidos datos de campo o ecosistemas modelo, que permitan el cálculo y la aplicación de factores de seguridad más precisos | Evaluación caso por caso |

- ii) En caso de que se disponga de datos sobre persistencia y bioacumulación, deberán tenerse en cuenta al derivar el valor final de la norma de calidad medioambiental.
- iii) La norma así derivada deberá compararse con las posibles pruebas procedentes de estudios de campo. En caso de que aparezcan anomalías, deberá revisarse la derivación con objeto de calcular un factor de seguridad más preciso.

La norma resultante deberá someterse a un examen crítico de expertos y a consulta pública con objeto, entre otras cosas, de permitir el cálculo de un factor de seguridad más preciso.

2.1.2. ENSAYO DEL CONSEJO DE MINISTROS DE MEDIO AMBIENTE DE CANADÁ.

El CCME (1991) ha desarrollado un protocolo para derivar valores guía de calidad del agua para la protección de la vida acuática, basado en resultados de toxicidad acuática y en información medioambiental. Para la obtención de los resultados toxicológicos se ensaya con al menos una especie de los siguientes grupos:

peces, invertebrados y algas. Los valores guía de un compuesto específico se obtienen a partir del más bajo nivel de efecto observado (LOEL) de los organismos ensayados.

Los valores guía se obtienen a partir de estudios de toxicidad aguda y crónica, sin embargo, se utilizan preferencialmente los resultados obtenidos en los estudios crónicos con respuesta no-letal. Cualquiera de los ensayos realizados deben mostrar una relación clara dosis/respuesta y las LOEL deben ser estadísticamente significativas.

Usando el ensayo de CCME, los valores guía se desarrollan a partir de estudios crónicos multiplicando el valor más sensible LOEL por un factor de seguridad de 0,1. La aplicación de un factor de seguridad se realiza para tener en cuenta diferentes sensibilidades de organismos acuáticos a los compuestos químicos, y la extrapolación de los resultados de laboratorio al medio natural. En caso de disponer de datos de toxicidad aguda y crónica se utiliza la relación entre ambas para estimar a largo plazo la concentración de no-efecto a partir de resultados letales obtenidos en ensayos de exposición aguda. En caso de no disponer de resultados de toxicidad crónica, los valores guía se obtienen directamente a partir de estudios de toxicidad aguda. En este caso, se aplican diversos factores de seguridad en función de la persistencia del compuesto en el medio natural. Para compuestos persistentes (vida media en el agua mayor a 8 semanas) se recomienda aplicar un factor de seguridad de 0,01, y para compuestos no-persistentes (vida media en el agua menor a 8 semanas) se recomienda aplicar un factor de seguridad de 0,05.

2.1.3. ENSAYO DEL MINISTERIO DE MEDIO AMBIENTE Y ENERGÍA DE ONTARIO.

El Ministerio de Medio Ambiente y Energía de Ontario utiliza un método basado en diferentes efectos para la formulación de los valores guía de calidad en agua (WQG) para la protección de la vida acuática (OMOE, 1992). Este proceso comienza con la búsqueda bibliográfica de información relativa acerca de la sustancia que se esté considerando. La búsqueda se centraliza fundamentalmente en la obtención de resultados de toxicidad acuática, bioacumulación, propiedades organolépticas, capacidad de modificar el sabor de especies acuáticas comerciales, genotoxicidad, límites de consumo, impactos en la fauna, y otros datos relativos a su posible interacción con el medio ambiente. Otra información complementaria que también se tendrá en cuenta son notificaciones de sucesos ambientales, fuentes, y criterios de calidad en agua y valores guía de otras agencias. El valor numérico seleccionado como estándar de calidad ambiental se obtiene valorando críticamente toda esta información por un comité de expertos. Para la realización de estas evaluaciones y determinación de un *valor guía* sólo se realiza cuando la información recopilada es suficiente.

Para este proceso de evaluación de los compuestos se ha establecido un procedimiento para la obtención de un valor toxicológico representativo. Así, los valores guía de calidad de aguas se determinan a partir del nivel de efecto más bajo observado (LOEL) del conjunto de datos toxicológicos (OMOE 1992). Los resultados toxicológicos pueden obtenerse de estudios de toxicidad aguda y crónica, sin embargo se consideran especialmente los estudios crónicos con respuesta no-letal. Para considerar cualquier dato toxicológico, los estudios deben demostrar una relación clara dosis-respuesta y la LOEL debe ser estadísticamente significativa. Si del proceso de búsqueda bibliográfica se han cubierto unos mínimos requisitos de calidad de datos, el *valor guía* de calidad preliminar se consigue multiplicando la LOEL seleccionada por un factor de incertidumbre estándar (0,1). Si sólo se dispone de unos pocos datos toxicológicos, el WQG preliminar se calcula aplicando a la LOEL seleccionada, un factor de incertidumbre más conservativo determinado por el comité de expertos y basado en la cantidad y calidad de datos disponibles.

El WQG preliminar determina la base toxicológica para el posterior proceso de desarrollo del *valor guía*.

Para aquellas sustancias susceptibles a bioconcentrarse significativamente en los tejidos de la biota acuática se debe hacer un procedimiento aparte que considere esta bioacumulación. Este proceso se realizará para compuestos que presenten un factor de bioconcentración (BCF) > 1000, un log Kow > 4, o es no-polar.

En el caso en el que se hayan definido concentraciones límites para el consumo (concentración de residuos de contaminantes en especies comerciales), bien sea para consumo humano o para la protección de la vida acuática, estos niveles se dividen por el BCF al objeto de obtener una estimación de la concentración de la sustancia en el agua que puede considerarse aceptable en la concentración en tejidos (OMOE, 1992). Este valor se compara con el *valor guía* preliminar obtenido a partir de los resultados toxicológicos. El valor más bajo es el que se selecciona como *valor guía* preliminar.

Otros factores importantes que se evalúan son la mutagenicidad de la sustancia, su impacto potencial en el sabor y olor del agua y de la carne animal, interacción en los usos recreativos, y los criterios de calidad en sedimentos.. El resultado de cualquiera de estas evaluaciones pueden usarse para ajustar el WQG inicial de una forma apropiada.

Mediante el procedimiento descrito se obtienen valores guía de calidad ambiental genéricos, sin embargo, el Ministerio de Medio Ambiente y Energía de Ontario reconoce la necesidad de modificar los valores guía genéricos bajo ciertas circunstancias (OMOE, 1984). De acuerdo con los documentos de seguimiento y policía de agua de Ontario (OMOE, 1984), se pueden considerar desviaciones de los guías genéricos cuando:

- (1) Existan valores de fondo atípicos;
- (2) La interacción humana ha provocado concentraciones o condiciones ambientales irreversibles o el cambio presente una gran dificultad;
- (3) Los costes sociales y/o económicos para obtener los WQG puedan ser prohibitivos;
- (4) Las técnicas de tratamiento para la eliminación de ciertos compuestos no estén disponibles.

2.1.4. ENSAYO DE LA AGENCIA DE PROTECCIÓN DEL MEDIO AMBIENTE DE LOS ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

La Agencia de Protección del Medio Ambiente Norteamericana (USEPA) ha desarrollado un protocolo formal para derivar criterios numéricos de calidad de aguas para la protección de la vida acuática y sus usos (USEPA, 1980; USEPA, 1986; Stephan et al. 1985). Mediante este procedimiento, se compilan diferentes tipos de informaciones para la obtención del criterio final: propiedades físicas y químicas de la sustancia considerada, la toxicidad en animales y plantas acuáticas, bioacumulación en organismos acuáticos, y en los efectos potenciales en los consumidores de la biota acuática. El protocolo formal incluye procedimientos específicos para el cálculo de un valor agudo final (FAV), crónico final (FCV), planta final (FPV), y valor residual final (FRV), a partir de los datos disponibles y que cumplan unos mínimos requisitos. Por ejemplo, en la derivación de un valor de toxicidad aguda final para aguas de mar y/o estuáricas es necesario disponer de datos de toxicidad de al menos ocho familias de organismos marinos, incluyendo al menos dos familias de cordados, cinco familias de invertebrados, y cualquier otra familia (p.e. plantas). La máxima concentración a corto plazo (Criterio de Máxima Concentración; CMC) de la sustancias se calcula aplicando un factor de seguridad (0,5) al FAV. El valor más bajo de los FCV, FPV y FRV se usa para establecer la concentración media a largo plazo (Criterio de Concentración Continua; CCC). Este criterio se somete entonces a una revisión científica al objeto de evaluar si la información es completa y el resultado es apropiado.

Además de este protocolo para formular criterios nacionales genéricos, la USEPA también recomienda tres procedimientos distintos para derivar criterios de calidad de aguas en zonas específicas (USEPA, 1983), los cuales son:

- i) Procedimiento de recalculación;
- ii) Procedimiento de especies indicadoras; y,
- iii) Procedimiento de especies residentes.

PROCEDIMIENTO DE RECALCULACIÓN

EL procedimiento de recalculación es un método para derivar criterios de calidad en aguas para zonas específicas que sirve para identificar el rango real de sensibilidad de las especies de organismos acuáticos representado en el conjunto general de datos y las especies que están presentes (o que históricamente han estado presentes) en el lugar bajo consideración (USEPA, 1983). Usando este procedimiento, los datos de las especies no residentes en la zona específica se eliminan del conjunto de datos, utilizando exclusivamente en el procedimiento, resultados toxicológicos de las especies residentes. Entonces, se calcula un FAV de la zona específica siguiendo la misma metodología empleada para derivar el FAV general. El CMC de la zona específica se calcula aplicando un factor de seguridad particular para esta zona por el FAV. De la misma forma, el CCC se establece dividiendo el FAV calculado anteriormente por la relación entre la toxicidad aguda y crónica (TA/TC) establecida durante el desarrollo del criterio general. Esta técnica también proporciona una base para la determinación de FRV de la zona específica utilizando información del lugar.

En general, el procedimiento de recalculación puede ser usado para derivar criterios de calidad en aguas para zonas específicas sólo si se dispone del mínimo conjunto de datos que se requiere en el procedimiento para formular el criterio general, esto es, es necesario que existan datos de un mínimo de ocho especies residentes según las especificaciones reflejadas anteriormente. En este procedimiento, la familia residente más sensible al tóxico es la que establece el valor adoptándose como FAV. En el caso de no disponer de los datos mínimos necesarios, sería necesario realizar ensayos de toxicidad de laboratorio utilizando como organismos de ensayo las especies residentes necesarias para generar la información mínima requerida.

PROCEDIMIENTO DE ESPECIES INDICADORAS

El procedimiento de especies indicadoras es una poderosa herramienta para modificar los criterios de calidad de aguas genéricos en relación a las características únicas de la zona considerada. Este procedimiento se basa en la premisa de que las características físicas y/o químicas del agua puede variar de una zona a otra y puede influir en la biodisponibilidad, interaccionar con el compuesto de ensayo, etc., y por lo tanto, influir en el resultado de toxicidad de los contaminantes. En algunos casos, se han identificado los factores que influyen en la toxicidad de las sustancias xenobióticas. Ya se ha comentado anteriormente la dependencia de la toxicidad de los metales con la dureza del agua, y del amonio con el pH, la temperatura y la salinidad del agua (CCREM, 1987; MacDonald et al., 1987). La presencia de otros contaminantes en el agua y otros factores físico-químicos (así como la materia particulada en suspensión) puede afectar a la biodisponibilidad de la sustancia considerada.

Mediante este procedimiento se obtienen los efectos que originan las características de la zona en la biodisponibilidad y toxicidad sin la necesidad de disponer de la información detallada de la naturaleza de estas relaciones. Usando este procedimiento, para obtener los datos de toxicidad aguda es necesario realizar dos ensayos paralelos, uno con agua procedente de la zona específica, y otro con agua de laboratorio (sintética, etc.). Las especies utilizadas en estos ensayos son especies indicadoras. Generalmente se utiliza como especies indicadoras a las siguientes:

Especies indicadoras en aguas continentales:

- *Oncorhynchus mykiss* (pez, trucha arcoiris)
- *Pimephales promelas* (pez)
- *Ceriodaphnia dubia* y *Daphnia magna* (crustáceos, pulgas de agua)
- *Selenastrum capricornutum* (microalga)

Especies indicadoras en aguas de mar y estuarios:

- *Mysidopsis bahia* (crustáceo)
- *Cyprinodon variegatus* (pez, alevín de ciprínido)
- *Menidia beryllina*, *M. menidia*, y *M. peninsulae* (pez)

Estas especies (AFS, 1991) se seleccionan como indicadoras porque son fáciles de cultivar, suelen estar disponibles por diversos laboratorios de acuicultura de referencia, y generan datos consistentes (Willingham, 1988; MacDonald et al., 1989; Weber, 1993; Lewis *et al.*, 1994).

La información generada en estas investigaciones se utilizan para determinar la relación observada entre la toxicidad de la sustancia en aguas naturales y la toxicidad en agua de laboratorio. A esta relación se le conoce como relación agua efecto. Esta relación se utiliza para convertir el criterio general de máxima concentración a una CMC para la zona específica. Por ejemplo, si una sustancia es dos veces más tóxica en ensayos con aguas naturales que en el laboratorio, entonces el CMC general debe dividirse por un factor de dos para obtener el valor específico. El valor final de toxicidad aguda, se calcula entonces a partir del CMC para esta zona, esto es, multiplicando el CMC por un factor de seguridad. Finalmente, el FAV de la zona específica se utiliza para obtener el criterio de concentración continua de la zona específica mediante la relación $CCC = FAV(TA/TC)$.

Un valor final de toxicidad crónica (FCV) puede obtenerse mediante tres formas distintas usando el procedimiento de las especies indicadoras:

- a. El FAV específico puede dividirse por la relación aguda y crónica para cada compuesto, si se ha determinado esta relación.
- b. Los test de toxicidad aguda y crónica para al menos un pez o un invertebrado (usando bien especies residentes o indicadoras) deben realizarse *in situ*. Usando los resultados de estos bioensayos, se determina la relación TA/TC de cada especie. Los específicos se dividen por la media geométrica de estas relaciones para obtener el FCV específico.
- c. Se calcula la relación TA/TC a partir de resultados obtenidos en ensayos de toxicidad crónica realizados tanto en aguas naturales como en agua de laboratorio. Es necesario realizar este procedimiento con al menos una especie de pez y de invertebrado. Finalmente se calcula la media geométrica de las relaciones TA/TC, y ésta se utiliza para modificar el criterio general.

PROCEDIMIENTO DE LAS ESPECIES RESIDENTES

El procedimiento de las especies residentes está diseñado teniendo en cuenta los dos factores principales que afectan a la obtención de criterio para zonas específicas: la sensibilidad de las especies residentes y, la influencia de las características del agua *in situ* en la toxicidad (USEPA, 1983). Este procedimiento conjuga los dos procedimientos anteriores de la siguiente forma. Utiliza las premisas del procedimiento de recalculación en cuanto a la selección de especies de ensayo, y para estas especies, se realizan ensayos con aguas naturales y agua de laboratorio al objeto de definir la base de datos de resultados de toxicidad a partir de la cual se diseña el criterio de calidad. Por tanto, como mínimo deben estar representadas en el conjunto de datos ocho familias de organismos acuáticos residentes en lugar de aplicación del criterio, a menos que no existan de forma natural ocho familias distintas de organismos. Los resultados de toxicidad aguda de las especies residentes se utilizan para calcular un FAV específico. El FCV se determina de cualquiera de las tres formas descritas en el procedimiento de especies indicadoras. El valor del criterio final específico para una zona concreta (esto es, CMC y CCC) se calcula siguiendo el procedimiento de cálculo del criterio general (Stephan et al. 1985).

2.1.5. ENSAYO DEL MINISTERIO DE MEDIOAMBIENTE DE BRITISH COLUMBIA PARA ZONAS ESPECÍFICAS

El Ministerio de Medio Ambiente de la Columbia Británica (BCMOE) ha desarrollado un procedimiento para la obtención de objetivos de calidad en aguas para la protección de la vida acuática en zonas específicas para la protección de la vida acuática.

El proceso de formulación de estos objetivos consta de varios estadios. El primero es la derivación de un criterio de calidad de aguas genérico, el cual se considera que puede ser aplicado a todos los cuerpos de aguas de la provincia. Estos criterios se formulan para la protección de los cinco más importantes usos del agua en British Columbia: suministro de agua potable e industria alimentaria, vida acuática y fauna, agricultura, actividades recreativas y aspectos estéticos del agua, y uso industrial (BCMOE, 1986). Para cada provincia se derivan los objetivos de calidad de las aguas utilizando un procedimiento que es más o menos coincidente con el ensayo de CCRME, o simplemente, se adoptan directamente los valores guía de calidad de agua de Canadá (CCREM, 1987). Puesto que este es el primer paso para la obtención de criterios en aguas específicas, los valores guía preliminares toman por lo tanto una base científica basado en resultados de toxicidad acuática.

El segundo paso es la obtención de información detallada del cuerpo de agua considerado y la realización de una valoración adecuada de las condiciones ambientales del sistema. En esta evaluación se debe considerar información relativa a fuentes de descarga puntual y/o difusa, usos del agua, figuras de protección legales de áreas coincidentes con el cuerpo de agua o adyacentes, calidad y cantidad de agua, y de las características biológicas del sistema. La evaluación de estos datos facilita la identificación de los usos del agua que deben ser protegidos en el cuerpo de agua y las variables de calidad del aguas prioritarias para las cuales es necesario establecer los objetivos. Para cada una de las sustancias, se identifica el uso más sensible y se evalúa el correspondiente criterio de calidad de agua para determinar su aplicabilidad en la zona.

En muchos casos, el criterio genérico del uso más sensible se adopta como el criterio de calidad del agua. Sin embargo, bajo ciertas circunstancias el criterio genérico puede modificarse para reflejar condiciones especiales. Por ejemplo, se sabe que la toxicidad de muchos metales en organismos acuáticos depende de la dureza del agua (CCREM, 1987) y, por lo tanto, el criterio para estas sustancias se expresa frecuentemente en términos de dureza del agua. Para el plomo, el criterio para 30 días es de 4 µg/L para una dureza del agua de 20 a 40 mg/L de CaCO₃ (Nagpal, 1987). EL valor del criterio se incrementa cuando aumenta la dureza del agua, reflejando esta relación entre toxicidad y dureza del agua. Por lo tanto, el objetivo para zonas específicas para el plomo puede determinarse basándose en la dureza del agua de ese sitio. Igualmente, el criterio provincial para el amonio total está expresado en términos de temperatura, pH, y salinidad. Por lo tanto, el objetivo para sitios-específicos del amonio total puede calcularse usando las ecuaciones relativas a la toxicidad del amonio en agua, la temperatura, pH y la salinidad.

El siguiente y último paso es considerar los niveles de fondo de los compuestos en la zona específica. Cuando estos niveles son altos, el criterio genérico puede modificarse y adaptarse al rango natural. En este caso, el criterio de calidad en aguas puede expresarse en términos de una interpretación estadística de los datos existentes de calidad de aguas (esto es, el 90 % concentración) o como un incremento admisible a partir de los niveles de fondo (como en el caso de la materia en suspensión; Singleton, 1985).

Con menos frecuencia, el criterio genérico puede modificarse cuando aparecen en el sistema comunidades biológicas atípicas. En esta última situación, el criterio genérico puede ser recalculado usando sólo los datos de toxicidad de estas especies.

Estos procedimientos proporcionan una forma razonable de adaptar los objetivos de calidad generales a las condiciones locales y, así conseguir un mayor nivel de protección en la zona específica.

2.1.6. PROCEDIMIENTO DE EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA PARA LA EVALUACIÓN DEL RIESGO AMBIENTAL DE SUSTANCIAS NUEVAS Y EXISTENTES

Uno de los objetivos del proceso de evaluación del riesgo ambiental de un compuesto químico es la protección de la funcionalidad de un compartimento ambiental. Dentro de esta protección se asume que los niveles de contaminantes en el medio deben estar por debajo de los valores PNEC (predicted no effect concentration, concentración por debajo de la cual la probabilidad de que se produzca un efecto inaceptable es mínima). Los PNEC se obtienen principalmente a partir de ensayos de laboratorio diseñados para evaluar la supervivencia, crecimiento y reproducción de los organismos de ensayo, parámetros que son clave en la dinámica de las poblaciones. En los actuales procesos de evaluación del riesgo se asume que la protección de todas las especies preservará la funcionalidad. El procedimiento global consiste en la evaluación de los PNEC en los tres compartimentos ambientales: agua, bentos y biota.

Respecto a la calidad de los datos ecotoxicológicos utilizados en la estimación, sólo se utilizan aquellos de acuerdo con los condicionantes expuestos en el Documento Técnico elaborado para tal fin (EC, 1996).

Para estimar los PNEC a partir de las respuestas de especies individuales, se suele utilizar un factor de evaluación al objeto de extrapolar los bioensayos al ecosistema. La selección de los factores de aplicación se encuentra descrito en el Documento Técnico (EC, 1996). En términos generales, los factores de evaluación más pequeños se aplican cuando existen suficientes datos en la mayoría de los niveles tróficos que puedan estar presentes en el ecosistema. En relación con los efectos umbrales, sólo se aceptan con un alto grado de confianza, cuando existen datos adicionales con otras especies y cuando estos umbrales se han obtenido para un periodo de exposición considerable. Los efectos crónicos tienen una gran consideración y se consideran más relevantes que los datos de toxicidad aguda. Los factores generales que se aplican son los siguientes:

| | <u>Factor de Evaluación</u> |
|---|------------------------------------|
| Al menos un L(E)C ₅₀ a corto plazo de cada uno de los tres niveles tróficos del conjunto de base | 1000 |
| Un NOEC a largo plazo | 100 |
| Dos NOEC prolongados de especies que representen dos niveles tróficos | 50 |
| NOEC prolongado de, al menos, tres que representen tres niveles tróficos | 10 |
| Otros casos, incluidos datos de campo o modelos de | Evaluación caso por caso |

Una aproximación similar se ha aplicado para la obtención de los criterios de evaluación ecotoxicológica (EAC: ecotoxicological assessment criteria) en el medio marino dentro del convenio OSPAR (OSPAR, 1998). El principio utilizado para la derivación de los EAC se basan también en una concentración extrapolada basada en información ecotoxicológica. Los factores de extrapolación que se aplican a los valores NOEC y L(E)C₅₀ varían dependiendo del número y calidad de datos disponibles. Los EAC se calculan exclusivamente cuando existen datos disponibles de al menos tres especies utilizadas para determinar los objetivos de calidad en aguas. Los factores que utilizan son los siguientes:

| | <u>Factor de extrapolación</u> |
|---|---------------------------------------|
| Aplicar a la menor concentración L(E)C ₅₀ cuando existen pocos datos disponibles | 1000 |
| Aplicar a la menor concentración L(E)C ₅₀ cuando existen una base de datos extensa la cual contiene un rango amplio de taxones, o a la concentración más pequeña EC ₅₀ o NOEC obtenida de un conjunto suficiente de resultados de toxicidad crónica | 100 |
| Aplicar a la menor NOEC obtenida en ensayos de toxicidad crónica de un número representativo y suficiente de especies | 10 |

2.1.7. APROXIMACIÓN A LOS NIVELES DE FONDO DE LOS COMPUESTOS EN AGUAS

En este ensayo, se determinan los niveles de fondo de un contaminante o un compuesto en las aguas los cuales van a servir de base para definir unas condiciones de calidad del agua aceptables para ese cuerpo de agua concreto. Este procedimiento se basa en la premisa de que los cuerpos de agua superficial que presenten aguas de gran calidad no deben degradarse de ninguna forma (CCREM, 1987). Este ensayo se utiliza generalmente para establecer objetivos de calidad de las aguas en cuerpos de agua relativamente prístinas (Mac Donald y Smith, 1990), o cuando los niveles de fondo superan los objetivos de calidad ya establecidos.

Los valores guía de calidad desarrollando este método se pueden establecer al menos de dos formas. Primero, hay que definir estadísticamente el límite superior de fondo. Por ejemplo, Dunn (1989) definió este límite como el valor medio mas dos veces la desviación estándar. Breidt *et al.* (1991) utilizó el percentil de 90 para establecer estos límites. Otros autores también se basan en aproximaciones estadísticas similares a las descritas (Warn, 1982; Van Hassel y Gaulke, 1986). Koh (Koh *et al.*, 2002) utiliza el criterio de el valor medio mas tres veces la desviación estándar.

Una condición importante a tener en cuenta es que los objetivos de calidad que se definan, deben ser ligeramente superiores a los niveles de fondo. Para ellos es aconsejable estudiar la variabilidad espacio-temporal de los compuestos, a partir de los resultados obtenidos hay que hacer un balance crítico de estos niveles y decidir cuál es la mejor opción: considerar los valores superiores para el cálculo, tomar valores promedios, efectuar estudios de la distribución de los resultados, diseñar más de un objetivo de calidad dependiente de la estación climatológica, condiciones físico-químicas del agua, etc.

De cualquier forma, los niveles de fondo deben ser evaluados temporalmente, y en caso de ser necesario, recalculados los objetivos de calidad.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. DETERMINACIÓN DE VALORES GUÍA DE CALIDAD AMBIENTAL DE LAS VARIABLES FÍSICO-QUÍMICAS

En este apartado se resume el procedimiento utilizado para la selección de los criterios de calidad de los parámetros físico-químicos en las áreas de estudio.

Para la selección de los criterios de calidad o valores guía se ha utilizado el procedimiento basado en los niveles basales en el agua y en aproximaciones estadísticas, y descrito por diversos autores (Dunn, 1989; Breidt *et al.*, 1991; Mac Donald y Smith, 1990; Mac Donald, 1994).

En el Capítulo II se analizó la calidad ambiental de cuatro áreas litorales de estudio en función de un conjunto de parámetros físico-químicos. Uno de los objetivos de estos estudios ha sido obtener una base de datos que represente los niveles de fondo de las variables que caracterizan estas áreas ambientales. La información requerida para el desarrollo de estos criterios y que se incluye en el capítulo II es la siguiente:

- Estudio estadístico de las áreas litorales de estudio.
- Diagramas representativos de la distribución de los resultados.

El estudio estadístico de los resultados constituye la información base necesaria para el diseño de los criterios de calidad ambiental. Los parámetros estadísticos que se han utilizado para el cálculo son la media y la desviación típica calculada a partir de la varianza. Las representaciones gráficas permitirán visualizar la adecuación del valor guía calculado, a la distribución de datos.

3.1.1. PROCEDIMIENTO DE CÁLCULO DE LOS CRITERIOS DE CALIDAD

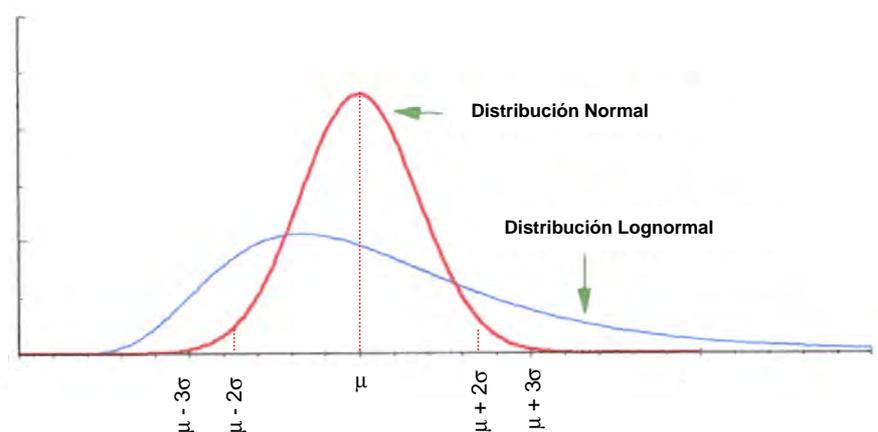
Los criterios de calidad de los parámetros físico-químicos de las áreas ambientales se han calculado siguiendo el procedimiento que se detalla en este apartado.

El primer paso es seleccionar un criterio de cálculo a partir del cual se obtenga el valor guía de calidad ambiental. El criterio seleccionado se basa en la teoría de la distribución normal. Este criterio ha sido utilizado por algunos autores para la determinación de guías de calidad ambiental a partir de niveles de fondo (Dunn, 1989; Breidt *et al.*, 1991; Mac Donald y Smith, 1990; Mac Donald, 1994).

La distribución normal o Gaussiana es una de las distribuciones de probabilidad más utilizada en el análisis de datos ambientales (USEPA, 1994). En la siguiente figura, se representa la forma típica de una distribución normal. Esta curva es simétrica alrededor de la media, esto es, la parte izquierda es una imagen especular de la parte derecha.

Los datos ambientales exhiben frecuentemente distribuciones no-negativas con una cola prolongada en la zona positiva. Algunos modelos de probabilidad paramétricos tienen estas propiedades (Weibull, gamma y distribución lognormal). La distribución lognormal se utiliza frecuentemente para modelizar datos de contaminación ambiental (USEPA, 1998). Muchos parámetros analizados en las áreas ambientales de estudio muestran esta forma. Para estos parámetros, la distribución que se ajusta más al conjunto de datos es la distribución lognormal. Los datos que se ajustan a una distribución lognormal mediante una sencilla transformación logarítmica, se ajustan a una distribución normal (Weber, 1993; USEPA, 1994; Lewis *et al.*, 1994; OECD; 1998).

En toda distribución normal se comprueba que en los intervalos que se especifican a continuación se encuentran un porcentaje muy importante de los datos (Peña, 1990).



$m \pm 2s$ se encuentra el 95,5% de la distribución

$m \pm 3s$ se encuentra el 99,7% de la distribución

μ : promedio de la población de datos

σ : desviación típica (raíz cuadrada de la varianza)

Por tanto, para cualquier conjunto de datos que se ajusten a ambas distribuciones (lognormal y/o normal), los límites que establecen las concentraciones $\mu \pm 2\sigma$ y $\mu \pm 3\sigma$ aseguran el 95,5 y 99,7 % del conjunto de datos. En términos de datos ambientales, estos límites representan los niveles de fondo de cualquier variable físico-química.

Para el diseño de criterios de calidad ambiental, se ha partido de la premisa de que las variables físico-químicas estudiadas se ajustan a una distribución normal en todas las áreas litorales de estudio. En el capítulo II del presente documento se puede comprobar como en general los parámetros se ajustan a esta distribución, y cuando no, a una distribución lognormal.

El siguiente paso ha sido calcular los diferentes valores $\mu + 2\sigma$ y $\mu + 3\sigma$ a partir de los resultados obtenidos en cada área ambiental. Puesto que se están calculando valores guía de calidad ambiental para el control de la contaminación, sólo interesa conocer el límite superior del rango, por ello, sólo se ha considerado el signo positivo de las anteriores expresiones.

Los valores obtenidos se han comparado con la distribución de datos al objeto de comprobar la adecuación de los valores calculados a la distribución de resultados.

Finalmente, se ha realizado el mismo proceso considerando el conjunto global de resultados al objeto de establecer un criterio de calidad ambiental para el Golfo de Cádiz.

Las siguientes gráficas ilustran los resultados obtenidos en cada área ambiental para uno de los parámetros físico-químicos.

Hay que decir que para el cálculo de los valores guía de calidad ambiental globales del Golfo de Cádiz, no se consideraron los niveles de fondo determinados en el Río Iro. Los niveles de contaminación de este sistema influirían demasiado en el cómputo del resultados, obteniéndose valores muy altos y no adecuados para los niveles de fondo del resto de las áreas ambientales.

En el diagrama de datos ordenados del parámetro se representa el límite de concentración que definen los valores $\mu + 2\sigma$ y $\mu + 3\sigma$. También se representa el valor de la media de la población. Puede observarse el gran porcentaje de casos que cubren ambos límites. Por encima de $\mu + 2\sigma$ se suelen situar los

resultados pertenecientes a las estaciones interiores y/o los resultados detectados como anómalos o extremos mediante los diagramas de box-whiskers.

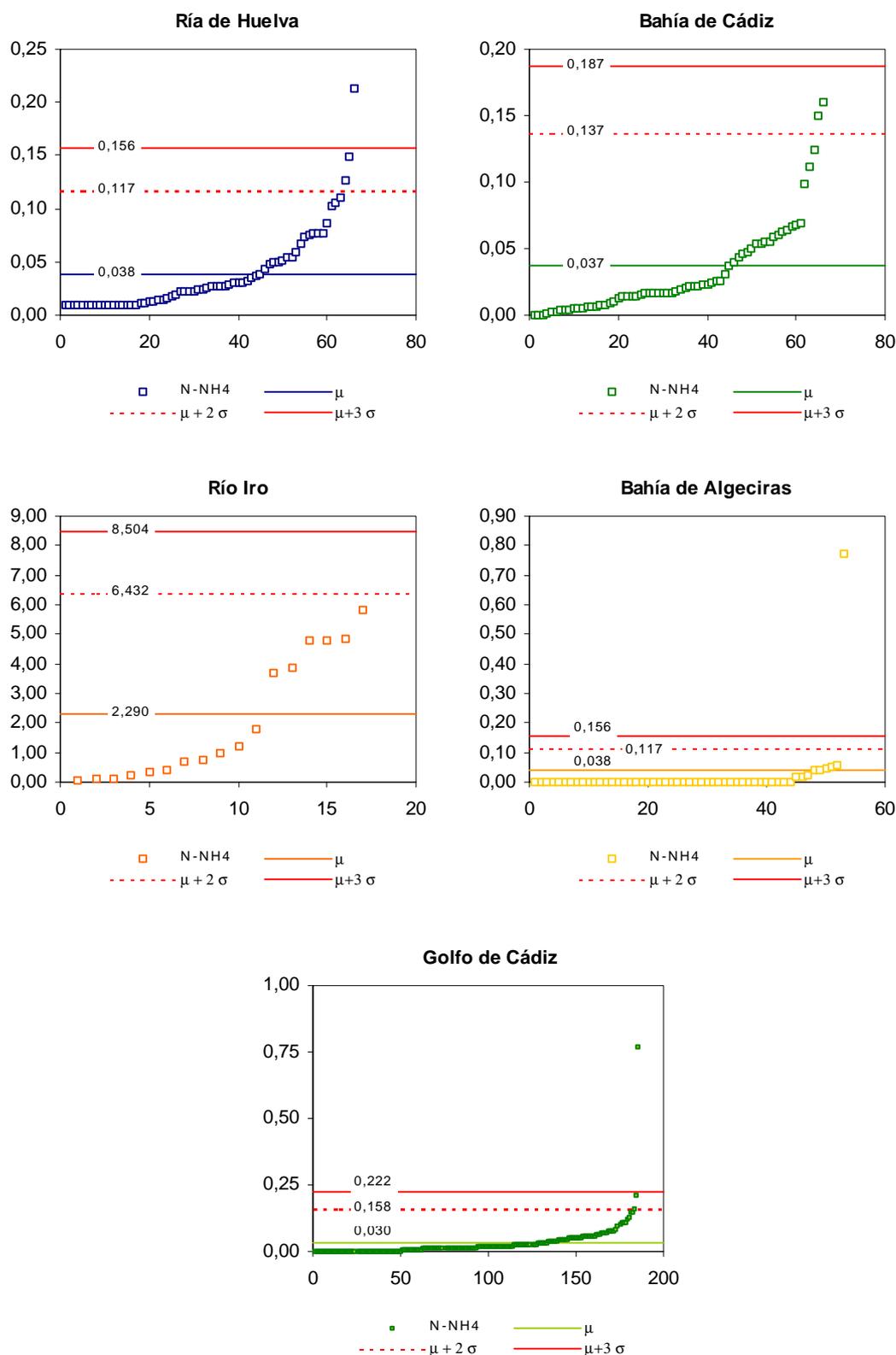


Figura C VI.1. Valores guía de calidad ambiental en las áreas litorales de estudio para el parámetro *amonio*.

Una cuestión importante a tener en cuenta es que los niveles guía de calidad ambiental que se seleccionen mediante el procedimiento basado en los niveles de fondo deben ser ligeramente superiores a los niveles naturales (MacDonald, 1994). Por encima de $\mu+2\sigma$ se suelen situar los resultados pertenecientes a las estaciones interiores y/o los resultados detectados como anómalos o extremos mediante los diagramas de box-whiskers. Por encima de $\mu+3\sigma$ se localizan sólo un 0,3 % de las observaciones incluyendo resultados anómalos y extremos, o en cualquier caso los valores máximos de la distribución de datos. Por tanto, para la obtención de los niveles guía en cada área ambiental se selecciona el límite que establece la concentración $\mu+3\sigma$ como nivel guía de calidad ambiental. Este criterio también ha sido utilizado por otros autores en otras aplicaciones relativas a datos medioambientales (Koh *et al.*, 2002),

Para el conjunto de datos del Golfo de Cádiz, se ha calculado un valor guía general a partir del promedio y la desviación típica de todo el conjunto de datos. Este valor se compara con los valores guía obtenidos para cada una de las áreas ambientales. Si alguna de las áreas ambientales presenta un nivel más permisible, éste debe seleccionarse como el nivel guía general al objeto de que las concentraciones de fondo del área en cuestión queden englobados en el valor guía de calidad general.

Para el ejemplo del *amonio* los valores guía obtenidos serían los siguientes:

Tabla C IV.1. Niveles guía de calidad ambiental del *amonio* en las áreas litorales de estudio

| <i>Amonio</i> (mg/L N-NH ₄) | Número de casos válidos | Media (m) | Desviación típica (s) | Nivel guía de calidad ambiental (m + 3s) |
|---|-------------------------|-----------|-----------------------|--|
| Ría de Huelva | 66 | 0,038 | 0,039 | 0,156 |
| Bahía de Cádiz | 67 | 0,037 | 0,050 | 0,187 |
| Río Iro | 15 | 2,290 | 2,071 | 8,504 |
| Bahía de Algeciras | 53 | 0,022 | 0,085 | 0,277 |
| Golfo de Cádiz | 234 | 0,030 | 0,064 | 0,222 |

El $\mu + 3\sigma$ para el Golfo de Cádiz es inferior al obtenido en la Bahía de Algeciras, por tanto, se define como nivel guía de calidad ambiental del parámetro *amonio* en el Golfo de Cádiz a 0,277 mg/L N-NH₄⁺.

Una vez definido el procedimiento, se han calculado los valores guía del conjunto de parámetros físico-químicos y se ha realizado un análisis crítico de cada uno de ellos y se compararon con los objetivos actualmente vigentes. Los resultados y el análisis crítico de éstos se incluye en el apartado de *Resultados y Discusión* del presente capítulo.

3.2. PROCEDIMIENTO PARA LA ELABORACIÓN DE UN CRITERIOS DE CALIDAD AMBIENTAL DE LOS COMPUESTOS QUÍMICOS DE ESTUDIO

3.2.1. CONSIDERACIONES PREVIAS

Antes de proceder a describir el procedimiento a partir del cual se han calculado criterios de calidad ambiental de los compuestos de ensayo hay que realizar algunas consideraciones previas:

Respecto a los datos de toxicidad acuática

En el presente estudio se han calculado las concentraciones de los compuestos que causan diferentes niveles de efecto en los organismos ensayados. Los resultados obtenidos se han evaluado críticamente al objeto de obtener finalmente resultados consistentes y concentraciones representativas con estrechos límites de confianza y obtenidas a partir de las técnicas de análisis adecuadas. A partir de estos análisis se ha concluido no utilizar ciertas expresiones o resultados contradictorios o con grandes rangos de variación, principalmente IC₅ e IC₉₅ en algas; EC₈₅ y superiores en *Artemia*; concentraciones alguísticas, u otros resultados evaluados negativamente. Estas concentraciones no han sido utilizadas en el cómputo de los estándares de calidad.

Con los resultados considerados “validos” se ha construido una base de datos toxicológicos. Esta base representa la toxicidad de los compuestos de ensayo con especies residentes en las zonas de estudio y por lo tanto, exclusivamente especies marinas.

Paralelamente, se ha construido una base de datos bibliográfica obviando resultados toxicológicos excesivamente repetidos o aquellos en los cuales no se especificaban suficientemente las condiciones de ensayo. Respecto a los datos bibliográficos se ha encontrado en general una gran proliferación de resultados toxicológicos en especies de agua dulce, mientras que sólo se ha podido encontrar un número muy reducido de resultados en especies marinas. Al objeto de diferenciar los datos pertenecientes a especies marinas o de agua dulce, se ha incluido una entrada en la cual se especifica este dato.

Ambas bases de datos, (resultados de este estudio y resultados bibliográficos) se han utilizado para diseñar los estándares de calidad de los compuestos específicos.

Respecto a la expresión de toxicidad y los factores de seguridad

La Directiva 60/2000/CE, *Marco de Aguas* es bastante explícita en relación con los factores de seguridad a aplicar en función de la cantidad y calidad de datos disponibles. Evidentemente, la situación óptima sería obtener un NOEC prolongado de cada taxón recomendado por la Directiva y aplicar el menor factor de seguridad. Para algunos compuestos, esto es posible si se consideran las dos bases de datos, pero tiene el inconveniente que al introducir resultados de especies acuáticas de agua dulce, el criterio de calidad ambiental seleccionado no se ha realizado rigurosamente para el medio marino, y más aún, no se han utilizado especies residentes.

El uso de las concentraciones de no-efecto (NOEC) como un parámetro en los ensayos de toxicología y ecotoxicología es un importante punto de discusión en la literatura científica, principalmente debido a los problemas estadísticos asociados con este concepto (Bruijn y Leeuween, 1996). Desde hace pocos años se han propuesto diversas alternativas, como el uso de las estimaciones de EC_p (Pack, 1993), el tradicional L(E)C₅₀ (Chapman et al. 1996), o la concentración de no efecto (NEC: non effect concentration) basada en la modelización de resultados de toxicidad (Kooijman & Bedaux, 1996). Estos autores presentan estos métodos como alternativas basándose en consideraciones estadísticas y científicas.

Los problemas asociados con el uso de NOEC fueron claramente identificados y resumidos por Pack (1993):

- (1) los NOEC deben ser una de las concentraciones de ensayo y por lo tanto depende de la elección de las concentraciones de ensayo;
- (2) el punto anterior puede implicar una gran variabilidad en las concentraciones NOEC
- (3) no es posible la precisión con los NOEC;
- (4) los NOEC no dan información de la pendiente de la curva concentración-efecto, esto es, el rango de sensibilidad del compuesto.

En su revisión, Pack concluye que las estimaciones de los EC_p pueden ser una mejor alternativa puesto que:

- (a) El valor es interpolado y es menos sensible a la elección de las concentraciones de ensayo;
- (b) Su precisión puede cuantificarse con intervalos de confianza;
- (c) Debido a (1) y (2) los EC_p valores son comparables; y
- (d) Si un modelo se ajusta a los datos, todas las respuestas tóxicas del organismo pueden caracterizarse.

En definitiva, las estimaciones del tradicional EC₅₀ o cualquier otro EC_p tienen un cierto número de ventajas desde un punto de vista estadístico. Sin embargo, hay también un cierto número de desventajas con estos métodos, como son la elección del modelo y las dificultades de computación, y la selección de cuál es el EC_p más apropiado. De acuerdo con Pack (1993), estos problemas pueden resolverse describiendo detalladamente el procedimiento de cálculo. Bruijn y Van Leeuwen (1996) opinan que la arbitrariedad de la elección del modelo dosis-respuesta puede ser siempre un problema puesto que no existe una base teórica para preferir los resultados obtenidos en un modelo con respecto a otro.

Chapman *et al.* (1996) han comentado que los NOEC son inapropiados si se utilizan para propósitos regulatorios y proponen los valores de L(E)C₅₀ como los más apropiados. Los comentarios principales que realizan al respecto son las siguientes:

- (i) la NOEC no es una buena estimación de la NEC,
- (ii) las NOEC son muy variables entre ensayos y pueden dar resultados contradictorios,
- (iii) pequeñas modificaciones en la ejecución de los ensayos pueden variar los resultados
- (iv) las EC₅₀ u otras estimaciones de puntos son más consistentes, más repetitivos y menos variables que las NOECs y pueden compararse entre ensayos.

De la misma forma, en el Capítulo III de este documento se ha comentado la inconsistencia de esta respuesta y la dependencia que tienen con el diseño experimental y el cálculo estadístico lo que hace que generalmente las concentraciones NOEC estén subestimadas, y por tanto los LOEC sobreestimadas. Otro voto a favor de los EC_p es que, como se puede comprobar en las tablas de resultados, muchas de las concentraciones EC_p documentadas son más sensibles que concentraciones umbrales obtenidas en periodo de exposición largos.

También es importante comentar que, si bien las diferentes normativas o procedimientos para derivar criterios de calidad dan una importancia superior a la obtención de los NOEC frente a los EC_p, la bibliografía consultada muestra una gran proliferación de resultados EC_p frente a los NOEC. Pensamos que es posible que eso sea así porque ensayar con periodos de exposición elevados conlleva muchos problemas de ejecución. Generalmente hay que alimentar a los organismos de ensayo, hay que controlar exhaustivamente las condiciones de ensayo, la alimentación puede interactuar con el tóxico, pueden producirse procesos de precipitación, biodegradación del compuestos, etc., en definitiva, son nuevas variables que hay que considerar a la hora analizar los datos. Por tanto, no es extraño que en general se prefiera ensayar a corto plazo, que emplear varias semanas o meses en un ensayo que puede estar

influenciado por demasiadas variables. Además, el uso de factores de seguridad para la obtención de los criterios finales asegura un nivel de protección adecuado para las especies acuáticas ensayadas a corto plazo.

Según lo expuesto, se llega a la conclusión que es más adecuado utilizar valores EC_p frente a los tradicionales NOEC. El problema es que la Directiva marca claramente que si se utilizan valores EC_{50} , el factor de seguridad a aplicar es muy alto (1000), mientras que si existe un número suficiente de NOEC el factor de seguridad aplicado disminuye a 100 pudiendo llegar a ser de 10 si existen datos consistentes de NOEC a largo plazo en los tres taxones recomendados.

En aquellos casos en los cuales se ha observado que los NOEC y EC_p se encuentran en los mismos órdenes de magnitud, aplicar 1000 frente a 10 como factor de seguridad es desmesurado. Además, si se aplicasen factores de 1000, las concentraciones representativas de la calidad ambiental de algunos compuestos van a estar próximas, cuando no por debajo, de los niveles de fondo de las aguas naturales e incluso por debajo de los límites de detección de los métodos analíticos.

Llegado a este punto, la pregunta entonces es ¿cuál es el factor de seguridad más apropiado?. Ya se ha comentado que el factor de 1000 es desmesurado, pero ¿sería apropiado el factor de 100?. El CCME (1991) multiplica el menor valor NOEC obtenido de la base de datos, por 0,01 (factor de 100) para compuestos persistentes en el agua (más de 8 semanas), y por 0,05 (factor de 20) para compuestos no persistentes en el agua (menos de 8 semanas). La USEPA (1986) utiliza un factor de 2 para obtener los valores finales de toxicidad aguda para la obtención del criterio a corto plazo (CMC).

El procedimiento que se propone dentro del convenio OSPAR (OSPAR, 1998) para la obtención de los EAC es muy similar al que establece la Directiva Marco, pero introduce una variación en uno de los criterios de selección del factor de seguridad (en este caso factor de extrapolación) al objeto de poder utilizar valores EC_{50} . El criterio dice que se podrá aplicar un factor de extrapolación de 100 a la menor concentración $L(E)C_{50}$ cuando existen una base de datos extensa la cual contiene un rango amplio de taxones, o a la concentración más pequeña EC_{50} o NOEC obtenida de un conjunto suficiente de resultados de toxicidad crónica.

Las aguas del Golfo de Cádiz se encuentran incluidas dentro del Convenio OSPAR, por tanto, no sería inapropiado utilizar este criterio para la elaboración de los estándares de calidad de los compuestos específicos de ensayo, en sustitución por supuesto del factor 1000, siempre que no sea posible aplicar un factor de seguridad inferior. Tampoco hay que olvidar que la Directiva Marco deja un margen de variación en la aplicación de los factores sobre todo si se realiza un análisis incluyendo datos de campo o modelos, que permitan el cálculo y la aplicación de factores de seguridad más precisos.

3.2.2. PROCEDIMIENTO PARA EL DESARROLLO DE CRITERIOS DE CALIDAD AMBIENTAL DE COMPUESTOS ESPECÍFICOS

A partir de los procedimientos anteriormente descritos, y prestando una atención especial al procedimiento descrito en la Directiva 60/2000/CE *Marco de Aguas* y a las consideraciones realizadas en el apartado anterior, se ha establecido un protocolo para el cálculo de las normas de calidad ambiental de los compuestos específicos ensayados.

Para cada compuesto específico se ha aplicado el procedimiento que a continuación se detalla. Para ilustrar el proceso, se presenta el desarrollo del criterio de calidad ambiental del compuesto LAS.

1. Selección y construcción de la base de datos de toxicidad

El primer paso que hay que realizar es crear para cada compuesto una base de datos de toxicidad a partir de dos fuentes de información:

- ✓ Ensayos de toxicidad de laboratorio
- ✓ Datos bibliográficos

Cada dato de toxicidad incluido en esta base está identificado por la siguiente información:

- ✗ Fuente de información
- ✗ Taxón
- ✗ Especie
- ✗ Expresión de toxicidad
- ✗ Periodo de exposición
- ✗ Concentración (mg/L)

En relación con los taxones o grupos de organismos se han clasificado en los siguientes:

- Algas
- Bacterias
- Crustáceos
- Peces
- Otros invertebrados

Una vez introducida la información, los datos se han ordenado en dos grupos en función de la fuentes de información -ensayos de laboratorio y datos bibliográficos-, y cada uno de estos grupos se ha organizado por taxones. Finalmente, se han ordenado las diferentes expresiones de toxicidad de cada taxón.

En el Capítulo III se analizó detalladamente las diferentes respuestas de toxicidad obtenidas y se realizaron algunas recomendaciones acerca de la utilización de algunas de las concentraciones obtenidas las cuales no fueron concluyentes (p.e Los EC_{50} a los 15 y 30 minutos del ensayo con LAS y bacterias luminiscentes). También se analizaron las diferentes expresiones de toxicidad obtenidas con diferentes técnicas de cálculo y se determinó cuáles de ellas son incongruentes entre sí (p.e. IC_5 y los niveles NOEC) o cuáles están sometidas a demasiado error (p.e. los LC_p con $p>85$ en los ensayos con *Artemia*).

Con el fin de utilizar el mismo criterio para todos los compuestos y las respuestas más usuales calculadas por los diversos autores, sólo se considerarán los valores que representan los umbrales de toxicidad (NOEC y LOEC) y los valores de $L(E)C_{50}$.

La Figura C IV.2. ilustra la base de datos del compuesto LAS.

| | A | B | C | D | E | F | G | H |
|-----|---------------|-------------|-------------------------|--------------|--------|--------------|-----------|-------------|
| | Tipo de datos | fuente | especie | Tipo de agua | Tiempo | Unid. Tiempo | Expresión | Valor medio |
| 1 | | | | | | | | |
| 2 | Laboratorio | Alga | Chaetoceros gracilis | Agua salada | 72 | h | EC50 | 3,450 |
| 3 | Laboratorio | Alga | Chaetoceros gracilis | Agua salada | 96 | h | EC50 | 3,632 |
| 4 | Laboratorio | Alga | Hannachiropsis pacifica | Agua salada | 72 | h | EC50 | 4,634 |
| 5 | Laboratorio | Alga | Hannachiropsis pacifica | Agua salada | 96 | h | EC50 | 5,050 |
| 6 | Laboratorio | Crustáceo | Artemia | Agua salada | 72 | h | EC50 | 4,753 |
| 7 | Laboratorio | Alga | Dunaliella salina | Agua salada | 72 | h | EC50 | 5,847 |
| 8 | Laboratorio | Alga | Tetraselmis chalybeata | Agua salada | 72 | h | EC50 | 6,036 |
| 9 | Laboratorio | Alga | Dunaliella salina | Agua salada | 96 | h | EC50 | 6,872 |
| 10 | Laboratorio | Crustáceo | Artemia | Agua salada | 72 | h | EC50 | 6,7 |
| 11 | Laboratorio | Crustáceo | Artemia | Agua salada | 48 | h | EC50 | 6,816 |
| 12 | Laboratorio | Crustáceo | Artemia | Agua salada | 48 | h | EC50 | 7 |
| 13 | Laboratorio | Alga | Isochrysis galbana | Agua salada | 72 | h | EC50 | 7,944 |
| 14 | Laboratorio | Alga | Tetraselmis chalybeata | Agua salada | 96 | h | EC50 | 0,223 |
| 15 | Laboratorio | Crustáceo | Artemia | Agua salada | 24 | h | EC50 | 9,6 |
| 16 | Laboratorio | Crustáceo | Artemia | Agua salada | 24 | h | EC50 | 8,626 |
| 17 | Laboratorio | Alga | Hannachiropsis pacifica | Agua salada | 96 | h | NOEC | 1,000 |
| 18 | Laboratorio | Alga | Hannachiropsis pacifica | Agua salada | 72 | h | NOEC | 1,000 |
| 19 | Laboratorio | Alga | Chaetoceros gracilis | Agua salada | 72 | h | NOEC | 1,000 |
| 20 | Laboratorio | Alga | Isochrysis galbana | Agua salada | 72 | h | NOEC | 2,000 |
| 21 | Laboratorio | Alga | Dunaliella salina | Agua salada | 72 | h | NOEC | 2,000 |
| 22 | Laboratorio | Alga | Tetraselmis chalybeata | Agua salada | 72 | h | NOEC | 2,000 |
| 23 | Laboratorio | Alga | Chaetoceros gracilis | Agua salada | 96 | h | NOEC | 3,000 |
| 24 | Laboratorio | Alga | Isochrysis galbana | Agua salada | 96 | h | NOEC | 4,000 |
| 25 | Laboratorio | Alga | Dunaliella salina | Agua salada | 96 | h | NOEC | 4,000 |
| 26 | Laboratorio | Alga | Tetraselmis chalybeata | Agua salada | 96 | h | NOEC | 4,000 |
| 27 | Laboratorio | Alga | Isochrysis galbana | Agua salada | 72 | h | NOEC | 1,000 |
| 28 | Laboratorio | Alga | Chaetoceros gracilis | Agua salada | 96 | h | NOEC | 1,000 |
| 29 | Laboratorio | Alga | Tetraselmis chalybeata | Agua salada | 96 | h | NOEC | 2,000 |
| 30 | Laboratorio | Alga | Isochrysis galbana | Agua salada | 96 | h | NOEC | 3,000 |
| 31 | Laboratorio | Alga | Dunaliella salina | Agua salada | 96 | h | NOEC | 3,000 |
| 107 | Biología | Peces | Parachanna orientalis | agua dulce | 40 | d | NOEC | 5,1 |
| 108 | Biología | Peces | Parachanna orientalis | agua dulce | 40 | d | NOEC | 8,4 |
| 109 | Biología | Microscopio | - | agua dulce | 10 | d | NOEC | 27 |

Figura C IV.2. Base de datos utilizada para el desarrollo de criterios de calidad ambiental para compuestos químicos

2. Obtención de valores representativos de toxicidad

Al objeto de trabajar con un número reducido de resultados de toxicidad de cada compuesto, se ha seleccionado para cada grupo de organismos, el valor más sensible de cada expresión (valor mínimo del conjunto de NOEC de algas, valor mínimo de las IC₅₀ de algas, etc.) y se ha construido una tabla como la que se representa en el ejemplo.

Respecto a estas tablas hay que comentar varias cosas. Puede observarse que se han construido tres columnas mostrando las concentraciones más sensibles de los tres conjuntos de datos. De izquierda a derecha son: (1) datos obtenidos en los estudios de toxicidad de especies residentes (datos en agua de mar, datos de laboratorio), (2) datos toxicológicos en agua de mar (datos en agua de mar, datos de laboratorio + datos bibliográficos), y (3) datos de toxicidad acuática (datos en agua de mar y agua dulce, datos de laboratorio + datos bibliográficos). En cada una de estas columnas se indica el número de datos disponibles y utilizados en el procedimiento de selección de la concentración más sensible.

Para una misma expresión de toxicidad se pueden seleccionar dos concentraciones, la obtenida a corto plazo ($\leq 96h$), y la obtenida a medio-largo plazo (más de 96 horas de exposición). Para la selección de la respuesta a corto plazo se considera el conjunto de resultados obtenidos en ensayos con periodos de exposición inferiores o iguales a 96 h (24, 48, 72 y 96). La concentración seleccionada es la menor de todo este conjunto de valores. Como respuesta a largo plazo se han incluido todas las concentraciones obtenidas en periodos de exposición superiores a 4 días. Estos periodos oscilan dependiendo del organismo de ensayo pero suelen estar comprendidos entre los 21 y 30 días en ensayos con peces. De este conjunto de datos se ha seleccionado la menor concentración obtenida, independientemente de que existan resultados para tiempo de exposición mayores. En el ejemplo del LAS, la NOEC a largo plazo

corresponde con el valor de 0,1 mg/L LAS obtenido a partir de un ensayo de 30 días. Otros resultados del conjunto de datos sería 5,1 mg/L LAS obtenida en un ensayo de 40 días.

Tabla C IV.2. Resultados toxicológicos más sensibles del LAS.

| Resumen de resultados más sensibles de cada grupo de organismos | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos del presente estudio | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos de toxicidad en agua de mar | | Valor mínimo obtenidos a partir de la base de datos de toxicidad acuática | | |
|---|---|--------------|--|--------------|---|--------------|-------|
| | Nº datos | Conc. (mg/L) | Nº datos | Conc. (mg/L) | Nº datos | Conc. (mg/L) | |
| Microalgas | NOEC (≤ 96 h) | 5 | 1,0 | 5 | 1,0 | 5 | 1,0 |
| | LOEC (≤ 96 h) | 10 | 1,0 | 10 | 1,0 | 10 | 1,0 |
| | IC ₅₀ (≤ 96 h) | 9 | 2,420 | 15 | 2,150 | 21 | 0,900 |
| Crustáceos | EC ₅₀ (≤ 96 h) | 6 | 5,753 | 9 | 1,420 | 26 | 0,110 |
| | EC ₅₀ (21 d) | | | | | 4 | 1,110 |
| Otros invertebrados | NOEC (≤ 96 h) | | | | | 1 | 1 |
| | LOEC (≤ 96 h) | | | | | 1 | 4,7 |
| | EC ₅₀ (≤ 96 h) | | | 3 | 1 | 4 | 1 |
| Peces | NOEC (30 d) | | | | | 6 | 0,1 |
| | LOEC (≤ 96 h) | | | | | 1 | 2,19 |
| | LOEC (30 d) | | | | | 6 | 0,25 |
| | EC ₅₀ (≤ 96 h) | | | 9 | 0,2 | 16 | 0,2 |

3. Aplicación del factor de seguridad

En relación con la aplicación de los factores de seguridad, ya se ha comentado con anterioridad que seleccionar el factor más adecuado no es fácil. La Directiva marca unas pautas pero permite una cierta flexibilidad en función de los estudios y el análisis de la situación que se realice.

Para seleccionar un adecuado factor de seguridad hay que tener en cuenta varios puntos. El primero de ellos y fundamental es que no debe ser contradictorio con las pautas que marca la Directiva, por tanto en principio, el o los factores se seleccionarán en el intervalo de 100 a 10 (en principio el factor de 1000 queda descartado). El siguiente punto a considerar es que la selección de un factor más conservativo o no, dependerá de la aplicación directa del criterio de calidad ambiental. Por ejemplo, no será lo mismo aplicar un factor de seguridad para establecer un criterio de calidad ambiental en aguas que presenten alguna figura de protección especial o un alto nivel ecológico (aguas especiales y/o sensibles), que establecer un criterio de calidad ambiental en aguas de poca renovación, muy afectadas por vertidos, con alto grado de antropización, etc.

En este punto y puesto que el procedimiento de cálculo se basa en simples operaciones matemáticas, se han aplicado varios factores de seguridad seleccionados a partir de los recomendados por otras legislaciones o agencias ambientales (ver apartado de antecedentes) y siempre y cuando se encuentren dentro del intervalo 100 a 10. Los factores seleccionados son:

| | |
|----------------------------|---|
| Factor de seguridad FS(1)= | 100 Máximo valor que puede tomar el factor |
| Factor de seguridad FS(2)= | 20 Factor recomendado por la CCME (1991) para compuestos no persistentes (vida media en el agua menor a 8 semanas). |
| Factor de seguridad FS(3)= | 10 Mínimo valor que puede tomar el factor. Factor recomendado por la CCME (1991) para compuestos persistentes (vida media en el agua mayor a 8 semanas). |

La siguiente tabla muestra como ejemplo, la aplicación del factor de seguridad de 100 a los resultados del LAS.

Tabla C IV.3. Aplicación del factor de seguridad (FS=100) a los datos más sensibles del LAS.

| Resumen de resultados más sensibles de cada grupo de organismos | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos del presente estudio | | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos de toxicidad en agua de mar | | | Valor mínimo obtenidos a partir de la base de datos de toxicidad acuática | | |
|---|---------------------------|---|-------------|----------|--|-------------|----------|---|-------------|----------|
| | | Nº datos | Conc (mg/L) | Con x FS | Nº datos | Conc (mg/L) | Con x FS | Nº datos | Conc (mg/L) | Con x FS |
| Microalgas | NOEC (≤ 96 h) | 5 | 1,0 | 0,01 | 5 | 1,0 | 0,01 | 5 | 1,0 | 0,010 |
| | LOEC (≤ 96 h) | 10 | 1,0 | 0,01 | 10 | 1,0 | 0,01 | 10 | 1,0 | 0,010 |
| | IC ₅₀ (≤ 96 h) | 9 | 2,420 | 0,02420 | 15 | 2,150 | 0,02150 | 21 | 0,900 | 0,009 |
| Crustáceos | EC ₅₀ (≤ 96 h) | 6 | 5,753 | 0,05753 | 9 | 1,420 | 0,01420 | 26 | 0,110 | 0,0011 |
| | EC ₅₀ (21 d) | | | | | | | 4 | 1,110 | 0,0111 |
| Otros invertebrados | NOEC (≤ 96 h) | | | | | | | 1 | 1 | 0,010 |
| | LOEC (≤ 96 h) | | | | | | | 1 | 4,7 | 0,047 |
| | EC ₅₀ (≤ 96 h) | | | | 3 | 1 | 0,010 | 4 | 1 | 0,010 |
| Peces | NOEC (30 d) | | | | | | | 6 | 0,1 | 0,001 |
| | LOEC (≤ 96 h) | | | | | | | 1 | 2,19 | 0,0219 |
| | LOEC (30 d) | | | | | | | 6 | 0,25 | 0,0025 |
| | EC ₅₀ (≤ 96 h) | | | | 9 | 0,2 | 0,002 | 16 | 0,2 | 0,020 |

4. Obtención del criterio de calidad ambiental

En este apartado es necesario realizar nuevas consideraciones respecto al procedimiento descrito en la Directiva Marco de Aguas.

Una vez aplicado el factor de seguridad, la directiva no especifica explícitamente qué debe hacerse, esto es, si debe seleccionarse la concentración más baja obtenida como criterio de calidad ambiental, si deben promediarse los resultados, si son preferentes los resultados de un taxón respecto a otros, etc.

Una cuestión importante a discutir de este procedimiento -y en general de todos los procedimientos para el diseño de criterios de calidad ambiental- es que se hace mucho hincapié en tener una base de datos de toxicidad representativa de las comunidades acuáticas, pero en ningún paso del procedimiento se considera el número de datos. Por lo tanto, si son representativos o no de la comunidad acuática es una decisión un tanto arbitraria. Este número de datos es muy importante por ejemplo en el procedimiento de la USEPA (USEPA, 1986) el cual determina mediante la frecuencia acumulada de los resultados ordenados de menor a mayor concentración, la concentración que representan el 0,05 de probabilidad. Esta concentración es la que se recomienda como valor final de toxicidad aguda puesto que sólo afectaría al 5 por 100 de las especies.

Al objeto de incluir la aportación del número de datos de cada taxón o grupo de organismos, se han consultado diferentes expresiones utilizadas en la actualidad para el cálculo de índices de calidad ambiental (Tabla C II.4).

De los índices consultados es especialmente interesante la expresión a partir de la cual se obtiene el índice WQE (Water Quality Evaluation) descrito por Stambuk-Giljanovic (1999):

$$WQE = \sum_{i=1}^n q_i w_i$$

Donde:

- $q_i w_i$: suma ponderada
- q_i : valores de calidad del agua del parámetro "i"
- w_i : factor de peso del parámetro "i"
- n : número de parámetros

Aplicando esta fórmula para el desarrollo de un *valor guía* de calidad ambiental, el significado de los parámetros sería el siguiente:

- q_i es el *valor guía* de calidad calculado para el taxón "i"
- w_i : factor de peso del taxón "i", el cual se obtendría dividiendo el número de datos de toxicidad pertenecientes al taxón "i" por el número total de datos.

Mediante este procedimiento, se obtiene un *valor guía* representativo del conjunto de taxones o grupos de organismos, y en definitiva de la comunidad acuática. Mediante esta expresión se evita que el resultado final esté influenciado por un valor de toxicidad excesivamente sensible de algún taxón y no representativo de la comunidad acuática.

Finalmente, la siguiente tabla ilustra este proceso de cálculo

Tabla C IV.4. Aplicación del factor de seguridad (FS=100) a los datos más sensibles del LAS.

| Valor guía obtenido a partir de los valores de $L(E)C_{50}$ | Grupo de organismos | Tipo de Respuesta (Aguda o Crónica) | n_i, N | Valor más sensible (mg/L) | $w_i = n_i/N$ | $q_i = \text{Conc} \cdot \text{FS}$ (FS=100) | $w_i \times q_i$ | Valor Guía = $\sum_{i=1}^n q_i w_i$ |
|---|---------------------|-------------------------------------|----------|---------------------------|---------------|--|------------------|-------------------------------------|
| Base de datos de toxicidad de este estudio | Algas | A | 9 | 2,42 | 0,6000 | 0,0242 | 0,0145 | 0,0375 mg/L LAS |
| | Crustáceos | A | 6 | 5,75 | 0,4000 | 0,0575 | 0,0230 | |
| | N total de datos | | 15 | | | | | |
| Base de datos de toxicidad en agua de mar | Algas | A | 15 | 2,15 | 0,4167 | 0,0215 | 0,0090 | 0,0138 mg/L LAS |
| | Crustáceos | A | 9 | 1,42 | 0,2500 | 0,0142 | 0,0036 | |
| | Otros invertebrados | A | 3 | 1 | 0,0833 | 0,0100 | 0,0008 | |
| | Peces | A | 9 | 0,2 | 0,2500 | 0,0020 | 0,0005 | |
| | N total de datos | | 36 | | | | | |
| Base de toxicidad acuática | Algas | A | 21 | 0,9 | 0,2958 | 0,0090 | 0,0027 | 0,0144 mg/L LAS |
| | Crustáceos | A | 26 | 0,11 | 0,3662 | 0,0011 | 0,0004 | |
| | Crustáceos | C | 4 | 11,1 | 0,0563 | 0,111 | 0,0063 | |
| | Otros invertebrados | A | 4 | 1 | 0,0563 | 0,0100 | 0,0006 | |
| | Peces | A | 16 | 2 | 0,2254 | 0,0200 | 0,0045 | |
| | N total de datos | | 71 | | | | | |

Esta tabla es de por si una base de datos de toxicidad de forma que sería muy sencillo recalculer estos criterios o confirmarlos a medida que se fuesen obteniendo más resultados de toxicidad acuática en agua de mar.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. VALORES GUÍA DE CALIDAD AMBIENTAL DE LAS VARIABLES FÍSICO-QUÍMICAS

En este apartado se muestran y comentan los *valores guía* obtenidos para cada uno de los parámetros en las áreas litorales de estudio. El desarrollo de este apartado es el siguiente. Se ha analizado detalladamente el primer parámetro incluyendo aspectos tales como valores obtenidos, adecuación del valor obtenido al conjunto de resultados, determinación de un valor general para el Golfo de Cádiz y comparación con los objetivos de calidad vigentes. Para el resto de parámetros, el comentario será más breve pero sin pérdida de información, se comentarán los resultados y las conclusiones, más aquellas peculiaridades observadas interesantes de comentar.

Los parámetros seleccionados para establecer criterios de calidad ambiental son los siguientes: amonio, nitritos, nitratos, nitrógeno disuelto, fosfatos, fósforo total, silicatos y carbono orgánico total.

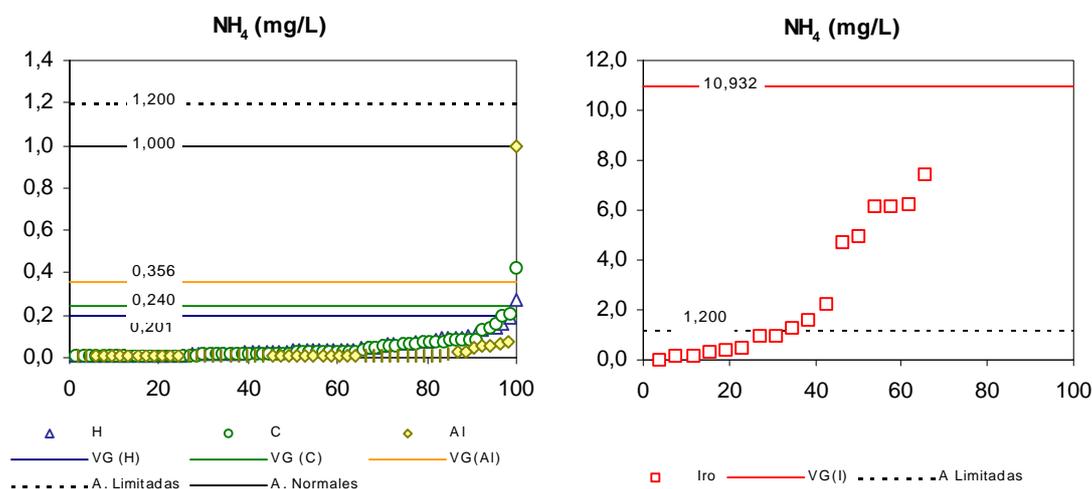
4.1.1. NITRÓGENO-AMONIO

Los niveles guía de calidad ambiental para el parámetro *amonio* son los siguientes:

Tabla C IV.5. Niveles guía de calidad ambiental del amonio en las áreas litorales de estudio

| Amonio (mg/L N-NH ₄) | Número de casos válidos | Media (m) | Desviación típica (s) | Nivel guía de calidad ambiental (m + 3s) |
|----------------------------------|-------------------------|-----------|-----------------------|--|
| Ría de Huelva | 66 | 0,038 | 0,039 | 0,156 |
| Bahía de Cádiz | 67 | 0,037 | 0,050 | 0,187 |
| Río Iro | 15 | 2,290 | 2,071 | 8,504 |
| Bahía de Algeciras | 53 | 0,022 | 0,085 | 0,277 |
| Golfo de Cádiz | 234 | 0,030 | 0,064 | 0,222 |

Agua Especial, 0,467 mg/L; Agua Limitada, 0,934 mg/L; Agua Normal y Agua menos limitada: 0,778 mg/L N-NH₄⁺



Los valores guía para nutrientes en aguas litorales definen una concentración límite de nutrientes por debajo de las cuales se considera que el agua es de "calidad". Por tanto, cuanto menor sea el límite definido, más exigente y proteccionista será el valor guía. Para el parámetro *amonio*, el valor guía más exigente lo define la Ría de Huelva, seguido de la Bahía de Cádiz, Bahía de Algeciras, y por último y con mucha diferencia respecto al resto, el Río Iro.

Una vez obtenidos los valores, es necesario comprobar que estos criterios están bien diseñados y permitirán ser utilizados como niveles de referencia para el control de la contaminación de las aguas. Un ejercicio práctico para comprobarlo es observar la distribución de las concentraciones que se han utilizado para el cálculo del criterio. Para ello se han consultado los histogramas de frecuencia y los diagramas de datos ordenados mostrados en el capítulo II.

Para el parámetro *amonio*, los histogramas de frecuencia de la Ría de Huelva, Bahía de Cádiz y Bahía de Algeciras muestran un agrupamiento de casos en torno a las clases correspondientes a las concentraciones inferiores, asemejándose la distribución más a una forma lognormal que a una normal o gaussiana. Esta forma lognormal en la distribución presenta una ventaja y un inconveniente respecto al nivel guía. El inconveniente es que el valor guía calculado está sobreestimado, es decir, para un área concreta se ha definido un límite guía de amonio muy superior a las concentraciones medidas en esta área. La ventaja es que permite una cierta flexibilidad en las concentraciones de amonio del medio, dicho de otra forma, ligeros aumentos de amonio en las aguas van a cumplir el criterio de calidad ambiental.

Como ya se ha comentado anteriormente, actualmente existen objetivos de calidad vigentes de un conjunto amplio de parámetros, en aguas litorales andaluzas (BOJA, 1997). Estos objetivos de calidad están definidos como concentraciones que no deben ser sobrepasadas en las aguas. Los valores guía diseñados tienen la misma filosofía pero no son tan estrictos. Los objetivos de calidad están definidos para todas las aguas litorales independientemente de las particularidades y el estado de calidad ambiental actual de cada cuerpo de agua específico. Los valores guía por el contrario, están diseñados en función de las particularidades y los niveles de fondo actuales. Por tanto, un aspecto importante a incluir en este apartado es comparar los valores guía con los objetivos de calidad vigentes y establecer la necesidad de rediseñar unos u otros con el objetivo de encontrar el mejor nivel de protección del medio acuático.

En la tabla de resultados mostrada anteriormente se incluyen los objetivos de calidad de las aguas litorales andaluzas. Si bien las aguas de estudio están clasificadas como normales o limitadas por la legislación autonómica, también se incluyen los valores de aguas especiales y menos limitadas.

En el estudio comparativo de las zonas de estudio incluido al final del capítulo II se incluyó una tabla para cada variable físico-química, en la cual se representan el porcentaje de muestras que cumplen los objetivos de calidad de las aguas andaluzas. Para el parámetro *amonio* se obtiene que todas las observaciones realizadas en Huelva, Cádiz y Algeciras cumplen con los objetivos de calidad ambiental del amonio (AL= 1,2 mg/L; AN= 1,0 mg/L). En el estuario del Río Iro, sólo el 51 % de las observaciones cumplieron los objetivos de calidad de aguas limitadas (Figura C II.16).

Comparando los niveles guía con los objetivos de calidad se obtiene que para la Ría de Huelva, Bahía de Cádiz y Bahía de Algeciras los valores guía calculados son muy inferiores a los establecidos en cualquiera de los cuatro tipos de agua de la normativa. Estas tres áreas cumplen en el 100% de los casos los objetivos de calidad legales, y en al menos un 97,3% de los casos los valores guía. Los porcentajes son prácticamente iguales, pero el valor guía es más representativo y proteccionista.

No hay que olvidar que uno de los objetivos fundamentales de la Directiva Marco de Agua es proteger el estado de calidad actual de todos los cuerpos de agua sin permitir su contaminación, e intentar mejorar la calidad de los sistemas acuáticos degradados. Por tanto, si cuerpos de agua que presentan un grado de antropización media-fuerte como son Ría de Huelva, Bahía de Cádiz y Bahía de Algeciras, exhiben niveles de contaminantes muy inferiores a los objetivos de calidad vigentes, es recomendable revisar y redefinir éstos al objeto de que aseguren un nivel de calidad adecuado y no permitan aumentar la contaminación del medio.

Por otra parte, no es una buena estrategia establecer objetivos de calidad ambiental en áreas muy contaminadas y antropizadas como es el caso del Río Iro. El incumplimiento de los objetivos de calidad

sería generalizado y continuo en el tiempo. El procedimiento más lógico sería caracterizar esa contaminación y prevenir un mayor deterioro, y en un paso posterior, recuperar el ecosistema hasta alcanzar y mantener una calidad aceptable.

Los objetivos de calidad vigentes del amonio aplicados a las áreas de estudio son tan inadecuados en un sentido como en el otro, esto es, ni proporcionan una garantía de conservación de la calidad ambiental ni son de aplicación en áreas muy contaminadas. En función de los resultados obtenidos, se recomienda revisar los objetivos de calidad vigentes del parámetro *amonio*.

Respecto a las concentraciones que definen los niveles guía hay que comentar que el valor obtenido para el Río Iro es desmesurado en relación a los calculados para las otras áreas. En este caso, por la significación que tiene el término "*nivel guía de calidad*" y por el grado de contaminación que presenta el Río Iro, no sería conveniente utilizar esta terminología.

Finalmente, se ha calculado el *valor guía global* de las aguas litorales del Golfo de Cádiz a partir del estudio estadístico y la distribución de los resultados de todo el conjunto de estaciones a excepción de las correspondientes al río Iro. Éstas podrían distorsionar el resultado final hacia concentraciones elevadas y por tanto no se garantizaría la conservación del estado actual de las aguas de Huelva, Cádiz y Algeciras. Hay que notar que el valor obtenido es inferior al valor guía de la Bahía de Algeciras (y en general, será inferior al obtenido para una o varias áreas ambientales). Por tanto, para garantizar la protección completa de esta zona y puesto que este valor no es muy diferente del obtenido en el análisis global de estaciones, se selecciona el valor guía de Algeciras como el valor guía de las aguas litorales del Golfo de Cádiz para el parámetro *amonio*. Esta concentración es de 0,277 mg/L N-NH₄ expresado en términos de nitrógeno, o en términos de amonio 0,356 mg/L NH₄.

Antes de concluir este análisis, es necesario realizar una consideración especial a este parámetro. El amoniaco es tóxico para una gran número de especies. En el medio acuático, el amonio (NH₄⁺) está en equilibrio con el amoniaco (NH₃). Este equilibrio depende de varios factores pero fundamentalmente del pH y la temperatura del agua, por tanto, la toxicidad del amoniaco depende del pH y la temperatura. Una revisión completa de las relaciones entre la toxicidad, la especiación y las variables físico químicas se puede consultar en un documento publicado por la USEPA para establecer criterios de calidad ambiental del amonio (USEPA, 1999). El objetivo base de este documento es definir diversos criterios de calidad o niveles de seguridad de estos compuestos en las aguas para diferentes condiciones ambientales a partir de ensayos de toxicidad con especies acuáticas.

En el presente estudio, el objetivo es determinar niveles guía de los parámetros físico-químicos tradicionales de control de las aguas a partir de niveles de fondo. El procedimiento propuesto no contempla el factor toxicidad, sin embargo, las concentraciones que causan toxicidad consultadas son muy superiores a las concentraciones medidas en la Ría de Huelva, Bahía de Cádiz y Bahía de Algeciras. Para el caso del Río Iro, los niveles de amonio -y por tanto de amoniaco- son más críticos y en los órdenes de magnitud de las concentraciones tóxicas para algunas especies acuáticas (USEPA, 1999).

Por tanto y en función de lo expuesto se concluye que, **los niveles guía calculados para el amonio son válidos y adecuados a los niveles de amonio actuales en todas las zonas de estudio excepto en el Río Iro**. En esta zona litoral deberían revisarse en orden a estudiar la toxicidad de estas concentraciones en especies acuáticas.

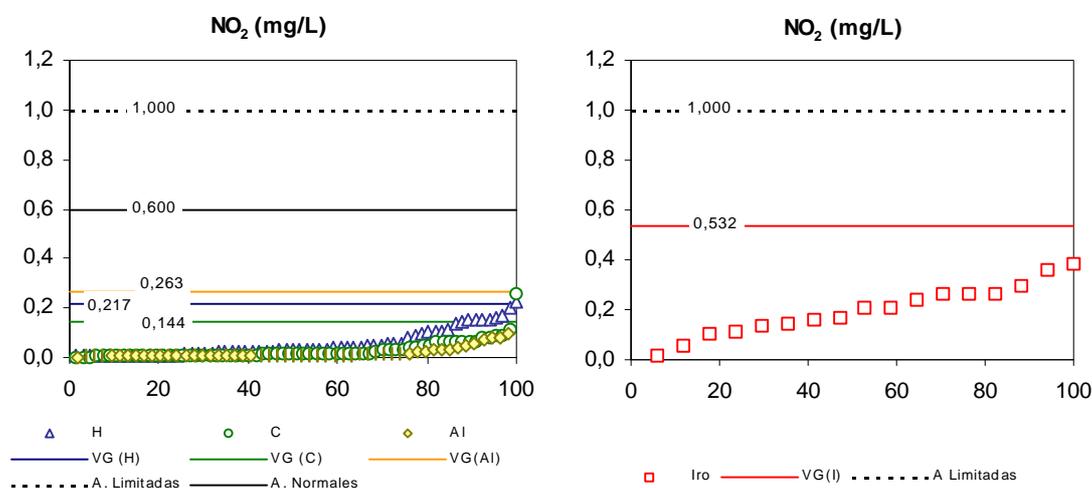
4.1.2. NITRÓGENO-NITRITO

Los niveles guía de calidad ambiental para el parámetro *nitritos* son los siguientes:

Tabla C IV.6. Niveles guía de calidad ambiental del parámetro *nitritos* en las áreas litorales de estudio

| Nitritos (mg/L N-NO ₂) | Número de casos válidos | Media (m) | Desviación típica (s) | Nivel guía de calidad ambiental (m + 3s) |
|------------------------------------|-------------------------|-----------|-----------------------|--|
| Ría de Huelva | 66 | 0,016 | 0,017 | 0,066 |
| Bahía de Cádiz | 67 | 0,009 | 0,012 | 0,044 |
| Río Iro | 15 | 0,067 | 0,032 | 0,162 |
| Bahía de Algeciras | 54 | 0,007 | 0,024 | 0,080 |
| Golfo de Cádiz | 221 | 0,012 | 0,019 | 0,069 |

Aguas Especiales, Aguas Normales y Aguas menos limitadas 0,183 mg/L; Aguas Limitadas, 0,304 mg/L N-NO₂-



Respecto a los histogramas de frecuencia del parámetro *nitritos* en la Ría de Huelva, Bahía de Cádiz y Bahía de Algeciras se ha observado un agrupamiento de casos en las clases correspondientes a las concentraciones inferiores, ajustándose la distribución más a una forma lognormal que a una distribución normal. Por tanto, los valores guía de calidad calculados son adecuados para estas zonas y permitirán una cierta flexibilidad en los resultados obtenidos en el seguimiento ambiental de estas áreas sin que se supere el criterio de calidad. La Bahía de Cádiz es la que establece valores más exigentes seguida de Huelva y Algeciras.

El histograma de frecuencias del Río Iro muestra una concentración de valores en las clases centrales asemejándose a una distribución normal. Para esta área, el valor guía calculado está más próximo a los valores promedios de las estaciones y por tanto, permitirá un rango de variación estrecho en la concentración de nitritos en las aguas.

El nivel guía de calidad ambiental del Golfo de Cádiz queda definido por el obtenido en la Bahía de Algeciras.

Respecto al cumplimiento de los objetivos de calidad, todas las observaciones realizadas cumplen con los criterios legales (Figura C II.16). Para las cuatro áreas ambientales, los niveles guías calculados son muy

inferiores a los objetivos de calidad vigentes. Por tanto, se **recomienda revisar y recalcular los objetivos de calidad de nitratos al objeto de disminuir los valores permitidos en las aguas.**

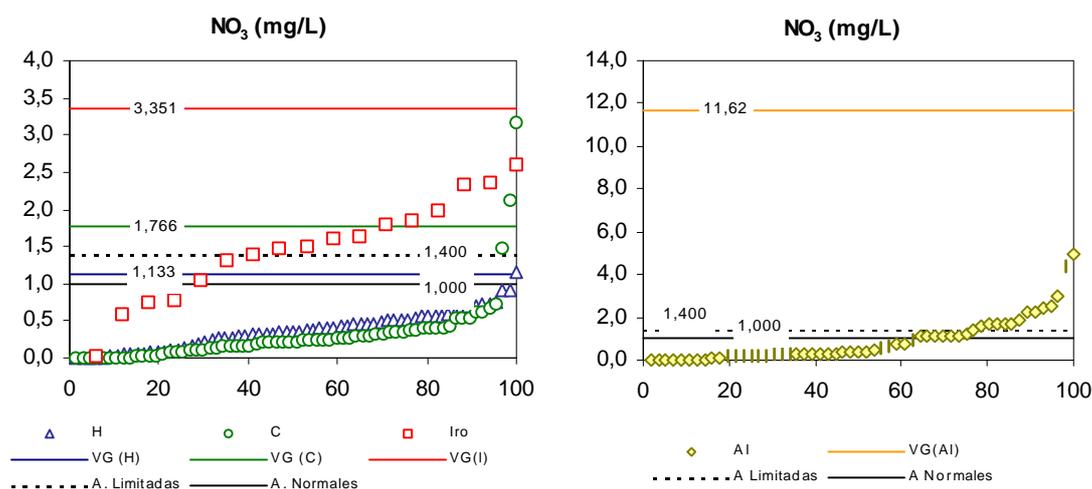
4.1.3. NITRÓGENO-NITRATO

Para los *nitratos* los niveles guía de calidad ambiental son los siguientes:

Tabla C IV.7. Niveles guía de calidad ambiental del parámetro *nitratos* en las áreas litorales de estudio

| Nitratos (mg/L N-NO ₃) | Número de casos válidos | Media (m) | Desviación típica (s) | Nivel guía de calidad ambiental (m + 3s) |
|------------------------------------|-------------------------|-----------|-----------------------|--|
| Ría de Huelva | 66 | 0,083 | 0,058 | 0,256 |
| Bahía de Cádiz | 67 | 0,073 | 0,109 | 0,399 |
| Río Iro | 15 | 0,366 | 0,130 | 0,757 |
| Bahía de Algeciras | 53 | 0,215 | 0,804 | 2,626 |
| Golfo de Cádiz | 219,0 | 0,177 | 0,516 | 1,725 |

Aguas Especiales, 0,158 mg/L; Aguas Limitadas, 0,316 mg/L; Aguas Normales y Aguas menos limitadas:0,226 mg/L N-NO₃-



Respecto a los histogramas de frecuencia del parámetro *nitratos* en la Ría de Huelva, Bahía de Cádiz y Bahía de Algeciras se observó un cierto agrupamiento de casos en las clases correspondientes a las concentraciones inferiores y medias y un porcentaje pequeño de casos en las clases correspondientes a las concentraciones más altas del histograma. Por tanto, los valores guía de calidad calculados son adecuados para estas zonas y permitirán una cierta flexibilidad en el seguimiento ambiental de estas áreas. La Ría de Huelva es la que establece valores más exigentes seguida de Cádiz, Iro y Algeciras.

El histograma de frecuencias del Río Iro muestra una agrupación de valores en las clases correspondientes a las concentraciones superiores. Para esta área, el valor guía calculado va ser muy exigente y va a permitir una variabilidad muy limitada en las concentraciones de nitratos del estuario del río Iro.

En este caso el nivel guía más alto y con gran diferencia, lo establece la Bahía de Algeciras. Esta valor se produce porque la distribución de resultados presenta una alta varianza y por tanto una alta desviación típica. Por tanto, no es conveniente utilizar esta área ambiental para la obtención del **criterio general**. Siguiendo también el criterio de no utilizar los valores obtenidos en el Río Iro, el criterio de calidad viene

definido por el máximo valor guía definido para Huelva y Cádiz. En este caso el valor es **definido por la Bahía de Cádiz en 0,399 mg/L N-NO₃ en términos de nitrógeno o de 1,766 mg/L NO₃ en términos de nitratos.**

Los niveles guías de la Bahía de Cádiz, Río Iro y Bahía de Algeciras superan los objetivos de calidad de este parámetro. Sólo los niveles guía de la Ría de Huelva cumple con estos criterios. Observando los porcentajes de observaciones que superaron los objetivos de calidad (capítulo II) se comprueba que no cumplieron los objetivos de calidad un pequeño porcentaje de estaciones de Cádiz y Huelva (menos del 5% de las observaciones), un porcentaje importante de observaciones de la Bahía de Algeciras (el 37 ó 26% de las observaciones según se consideren los objetivos de calidad de aguas limitadas o normales respectivamente), y más de la mitad de las observaciones realizadas en el Río Iro (58% según los objetivos de aguas limitadas, y el 72% de las muestras según el objetivo de aguas normales).

Por tanto, en este caso **los objetivos de calidad legales están mal seleccionados puesto que los niveles de fondo son superiores a los objetivos de calidad.** En este caso, **la revisión que se propone de este criterio es aumentar los niveles permitidos hasta al menos el nivel guía global propuesto.**

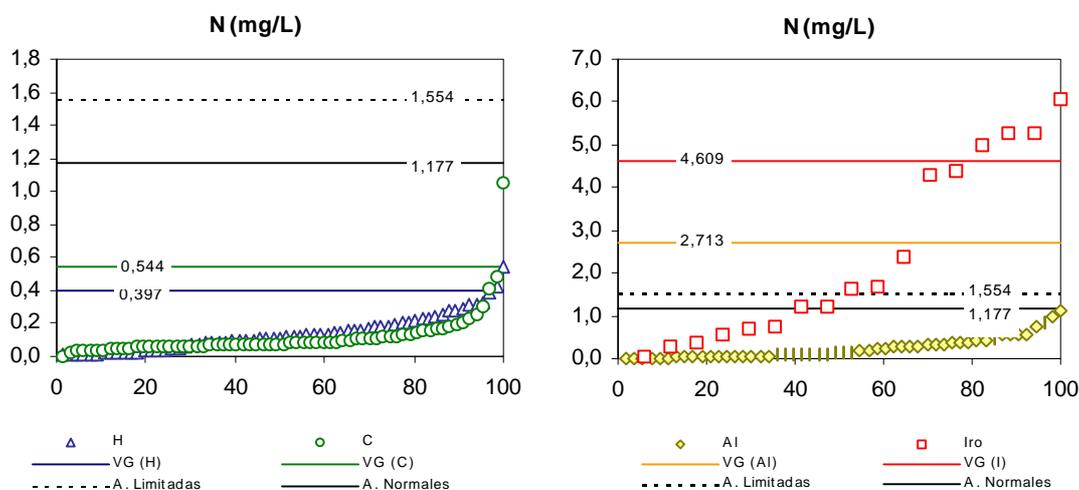
4.1.4. NITRÓGENO DISUELTO

Con el término *nitrógeno disuelto* se contempla la concentración de nitrógeno en el agua correspondiente al amonio, nitritos y nitratos. Los niveles guía de calidad ambiental obtenidos son los siguientes:

Tabla C IV.8. Niveles guía de calidad ambiental del parámetro *nitrógeno disuelto* en las áreas litorales de estudio

| Nitrógeno (mg/L N) | Número de casos válidos | Media (m) | Desviación típica (s) | Nivel guía de calidad ambiental (m+ 3s) |
|---------------------|-------------------------|-----------|-----------------------|---|
| Ría de Huelva | 66 | 0,137 | 0,087 | 0,397 |
| Bahía de Cádiz | 67 | 0,119 | 0,142 | 0,544 |
| Río Iro | 15 | 2,724 | 0,628 | 4,609 |
| Bahía de Algeciras | 54 | 0,239 | 0,825 | 2,713 |
| Golfo de Cádiz | 221 | 0,216 | 0,532 | 1,814 |

No hay definidos Objetivos de Calidad Ambiental. El valor resultante de sumar los objetivos de calidad ambiental del amonio, nitritos y nitratos en términos de nitrógeno son las siguientes: 1,553 mg/L para *aguas limitadas*, y 1,187 mg/L N para *aguas normales*.



Respecto a los histogramas de frecuencia del parámetro en la Ría de Huelva, Bahía de Cádiz y Bahía de Algeciras se observa un cierto agrupamiento de casos en las clases correspondientes a las concentraciones inferiores adoptando una distribución lognormal. Por tanto, los valores guía de calidad calculados son adecuados para estas zonas y permitirán una cierta flexibilidad en el seguimiento ambiental de estas áreas. La Ría de Huelva es la que establece valores más exigentes seguida de Cádiz, Iro y Algeciras.

El histograma de frecuencias del Río Iro muestra una agrupación de valores en dos grupos en las clases intermedias-altas. Para esta área, el valor guía calculado va ser muy exigente y va a permitir una variabilidad muy limitada en las concentraciones de nitrógeno de este sistema.

En este caso los niveles más altos lo establecen el Río Iro y la Bahía de Algeciras con gran diferencia respecto a la Bahía de Cádiz y la Ría de Huelva. Al igual que se realizó con el parámetro *nitratos* el **criterio de calidad se establece por el máximo valor guía definido para Huelva y Cádiz. En este caso el valor es definido por la Bahía de Cádiz en 0,544 mg/L N.**

Para este parámetro no existen objetivos de calidad definidos en la legislación andaluza. Sumando los objetivos de calidad del amonio, nitritos y nitratos en términos de nitrógeno, se obtendría el objetivo de calidad equivalente. Este es de 1,553 mg/L N en *aguas limitadas* y 1,187 mg/L N en *aguas normales*. Todas las observaciones realizadas en Huelva, Cádiz y Algeciras cumplieron con estos objetivos de calidad. En el Río Iro, aproximadamente la mitad de las observaciones no cumplieron con ambos criterios.

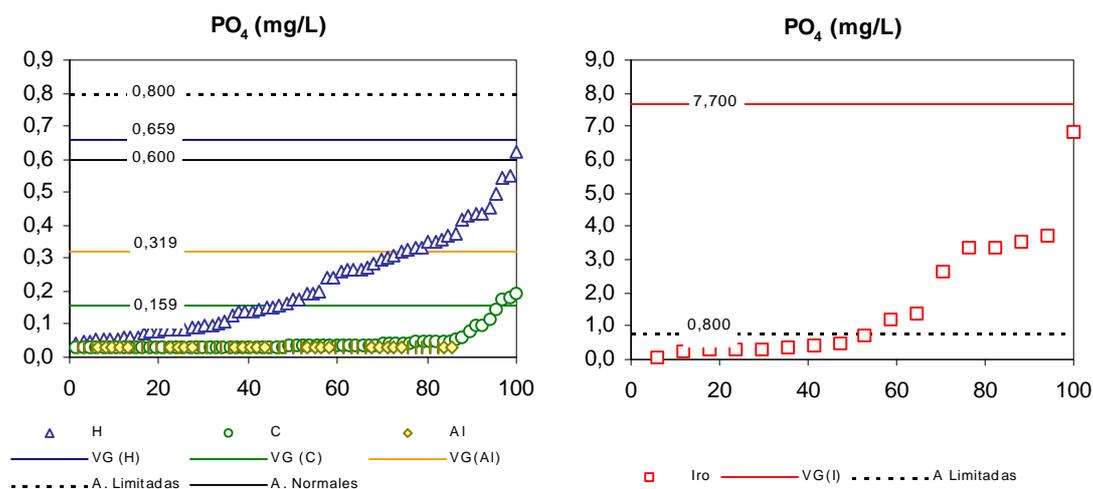
4.1.5. FÓSFORO-FOSFATO

Los niveles guía de calidad ambiental para *fosfatos* obtenidos en las áreas litorales de estudio son los siguientes:

Tabla C IV.9. Niveles guía de calidad ambiental del parámetro *fosfatos* en las áreas litorales de estudio

| <i>Fosfatos (mg/L P-PO₄)</i> | <i>Número de casos válidos</i> | <i>Media (m)</i> | <i>Desviación típica (s)</i> | <i>Nivel guía de calidad ambiental (m + 3s)</i> |
|---|--------------------------------|------------------|------------------------------|---|
| Ría de Huelva | 66 | 0,071 | 0,048 | 0,215 |
| Bahía de Cádiz | 67 | 0,014 | 0,013 | 0,052 |
| Río Iro | 15 | 0,626 | 0,628 | 2,511 |
| Bahía de Algeciras | 62 | <0,010 | 0,032 | 0,104 |
| Golfo de Cádiz | 224 | 0,029 | 0,044 | 0,162 |

Aguas Especiales, Aguas Normales y Aguas menos limitadas 0,600mg/L; Aguas Limitadas, 0,800 mg/L PO₄



Respecto a los histogramas de frecuencia del parámetro se observan distribuciones con forma lognormal en la Ría de Huelva, Bahía de Cádiz y Bahía de Algeciras. En la Bahía de Cádiz, se observa un porcentaje de muestras agrupadas en la clase de mayor concentración del histograma. Estas observaciones se corresponden a las estaciones interiores de la Bahía, por tanto el valor guía seleccionado va a ser muy estricto con las concentraciones de fosfatos de estas estaciones (C5F, C5E, y C5A) dejando muy poco margen de variación. En el Río Iro, la forma de la distribución requiere dos observaciones, una a bajas concentraciones y otra de menor magnitud a altas concentraciones; sin embargo, el valor tan elevado de la desviación típica permite dejar un margen de variación para este parámetro. La Bahía de Cádiz es la que establece valores más exigentes seguida de Algeciras, Huelva e Iro.

Hay que resaltar los valores promedio obtenidos en la Bahía de Algeciras y el valor guía obtenido. En diversos apartados de este documento se ha comentado y señalado la importancia que tiene el fósforo en la Bahía de Algeciras. En la caracterización y estudio de este parámetro en el *Capítulo II* se significó la carencia de fósforo a lo largo de toda la Bahía puesto que no se detectaba a este compuesto en casi la totalidad de las estaciones muestreadas. La estación AI 1E fue una excepción puesto que está muy próxima a la zona portuaria de Algeciras obteniéndose altas concentraciones de todos los parámetros analizados. En el *Capítulo III* en el apartado referente a los ensayos de LAS con diferentes aguas de dilución, se concluyó que las aguas de la Bahía de Algeciras presentan una gran limitación en fósforo y se recomendó diseñar el valor guía con precaución. El valor guía obtenido a partir de los niveles de fondo es de 0,104 mg/L P-PO₄ el cual es incluso mayor que el obtenido en la Bahía de Cádiz. Para la Bahía de Cádiz los valores promedios son bajos, pero en general, en las diferentes estaciones de muestreo se detectaron estos compuestos.

A priori se podría pensar que el valor guía de Algeciras está demasiado influenciado por la estación AI 1E. Sin embargo, este valor es más adecuado que el que se obtendría sin la contribución de esta estación. El valor guía que se obtendría estaría por debajo o próximo al límite de detección del método analítico, dicho de otra forma, el criterio de calidad ambiental en la Bahía de Algeciras sería que no se detectase fósforo en la Bahía. Por supuesto, desde un punto de vista ecológico este criterio sería incongruente puesto que es necesario que en las aguas existan una cierta cantidad de estos elementos. Mediante los valores guía lo que se obtiene es un límite para el control de la contaminación y para prevenir el deterioro de los ecosistemas acuáticos, pero debe permitir que las concentraciones naturales sean adecuadas para el funcionamiento de los ecosistemas.

En este caso los niveles más altos lo establecen el Río Iro y la Ría de Huelva. En este caso y siguiendo el procedimiento realizado con otros parámetros, el **criterio de calidad general de los fosfatos** lo define la Ría de Huelva en 0,215 mg/L de P-PO₄ o en términos de fosfatos es de **0,659 mg/L PO₄**.

Para este parámetro no existen objetivos de calidad en la legislación andaluza. Expresando el objetivo de calidad definido para el P total en términos de fosfatos se observa que el Río Iro incumple los objetivos de calidad para aproximadamente un 30% de las observaciones realizadas (Figura C II.16).

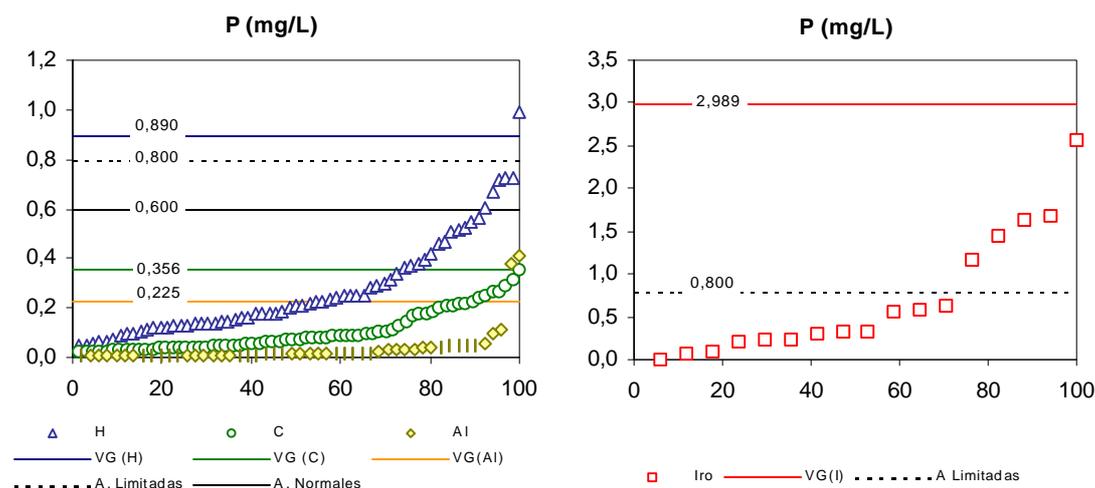
4.1.6. FÓSFORO

Los niveles guía de calidad ambiental para *fósforo total* obtenidos en las áreas litorales de estudio son los siguientes:

Tabla C IV.10. Niveles guía de calidad ambiental del parámetro *fósforo* en las áreas litorales de estudio

| <i>fósforo</i> (mg/L P) | Número de casos válidos | Media (m) | Desviación típica (s) | Nivel guía de calidad ambiental (m + 3s) |
|-------------------------|-------------------------|-----------|-----------------------|--|
| Ría de Huelva | 66 | 0,273 | 0,206 | 0,890 |
| Bahía de Cádiz | 67 | 0,105 | 0,084 | 0,356 |
| Río Iro | 15 | 0,801 | 0,729 | 2,989 |
| Bahía de Algeciras | 51 | 0,038 | 0,062 | 0,225 |
| Golfo de Cádiz | 217 | 0,125 | 0,159 | 0,601 |

Aguas Especiales, Aguas Normales y Aguas menos limitadas 0,600 mg/L; Aguas Limitadas, 0,800 mg/L P



La distribución de datos que sigue este parámetro es muy similar a la descrita para el parámetro *fosfatos*. Para el contenido de *fósforo total* en las aguas, el criterio más exigente lo establece la Bahía de Algeciras, seguido de la Bahía de Cádiz, Ría de Huelva y por último y con una gran diferencia sobre el resto de áreas litorales, el río Iro.

El **valor guía de calidad ambiental del fósforo para el Golfo de Cádiz** vienen definido por el valor guía de la Ría de Huelva en **0,890 mg/L P**.

Respecto a los objetivos de calidad, sólo en Cádiz y Algeciras se observó el cumplimiento de los criterios en el 100% de las observaciones realizadas. En Huelva un porcentaje pequeño no cumplió con los criterios de aguas limitadas y normales, y en el río Iro, un porcentaje importante de observaciones no cumplió con los objetivos vigentes (Figura C II.16).

Un aspecto interesante a comentar con este parámetro son las recomendaciones que se realizan para la redefinición de los objetivos de calidad vigentes. Comparando los valores guías obtenidos con los

objetivos de calidad se observa que el valor guía de la Ría de Huelva es superior a los objetivos definidos en aguas litorales andaluzas. Por tanto, para esta área ambiental los objetivos de calidad no están bien definidos y por tanto se propone una redefinición de éstos aumentando los niveles de fósforo permitidos. Por contra, la Bahía de Cádiz y Algeciras presentan valores guías mucho más exigentes, y por tanto, los objetivos de calidad son más permisibles en estas zonas y permitirían una cierta degradación de la calidad de las aguas en relación con este parámetro. En función de los resultados obtenidos en estas zonas, se recomendaría rediseñar los objetivos de calidad pero para hacerlos más exigentes con las concentraciones de *fósforo* en aguas.

Este caso sirve para ilustrar **la importancia que tiene el cálculo de los valores guía específicos para cada área ambiental**. Los criterios de calidad generales sirven como una primera aproximación pero no son la mejor herramienta para el control de la calidad ambiental de las aguas litorales. Las organizaciones gubernamentales o internacionales pioneras en el diseño de criterios de calidad abogan por ir sustituyendo estos criterios generales por criterios específicos que reflejen las características particulares de cada cuerpo de agua.

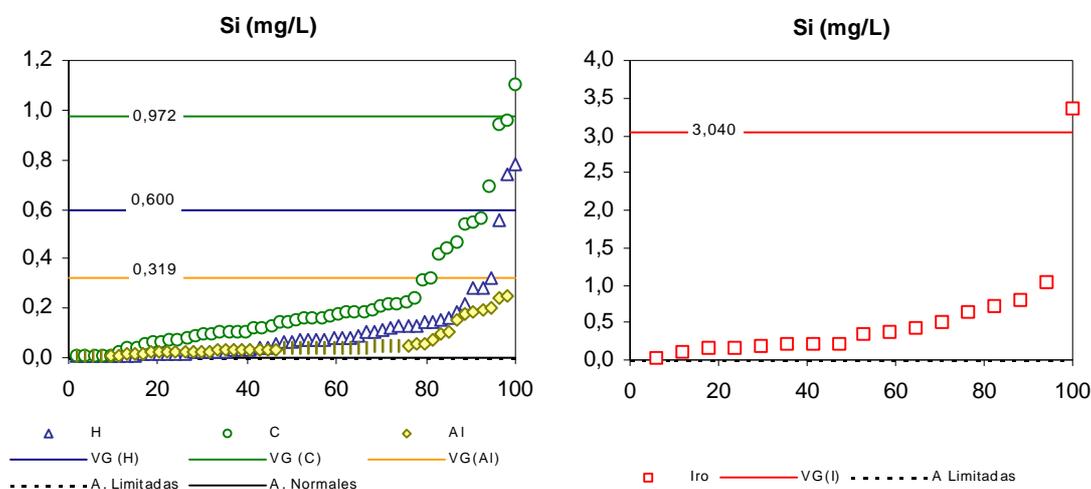
4.1.7. SÍLICE-SILICATOS

Los silicatos no constituyen un parámetro habitual en las normativas relativas a calidad de aguas. No obstante, se piensa que es un parámetro importante puesto que en los diversos análisis de muestras residuales realizados rutinariamente en el laboratorio se detectan concentraciones muy elevadas de este compuesto y por tanto puede ser un parámetro indicativo de la presencia de vertidos de esta naturaleza. Por tanto, los niveles guía de calidad ambiental para los silicatos obtenidos en las áreas litorales de estudio son los siguientes:

Tabla C IV.11. Niveles guía de calidad ambiental del parámetro *silicatos* en las áreas litorales de estudio

| <i>Silicatos (mg/L Si)</i> | Número de casos válidos | Media (m) | Desviación típica (s) | Nivel guía de calidad ambiental (m + 3s) |
|-----------------------------|-------------------------|-----------|-----------------------|--|
| Ría de Huelva | 54 | 0,111 | 0,163 | 0,600 |
| Bahía de Cádiz | 53 | 0,227 | 0,248 | 0,972 |
| Río Iro | 15 | 0,625 | 0,805 | 3,040 |
| Bahía de Algeciras | 54 | 0,061 | 0,086 | 0,319 |
| Golfo de Cádiz | 195 | 0,125 | 0,177 | 0,655 |

No hay definidos Objetivos de Calidad



En general la forma de la distribución de este parámetro en las todas las zonas es lognormal presentando algunas observaciones localizadas en altas concentraciones y correspondientes a las estaciones interiores o próximas a vertidos. Los valores guía pueden ser exigentes en estas estaciones y restringir la variabilidad de la concentración de sílice en las aguas.

Los valores guía más exigentes los muestra la Bahía de Algeciras seguida de la Ría de Huelva, Bahía de Cádiz y finalmente y con mucha diferencia respecto al resto de áreas, el Río Iro.

El criterio general para el Golfo de Cádiz lo define la Bahía de Cádiz en 0,972 mg/L Si.

Para este parámetro no existen objetivos de calidad en la legislación andaluza.

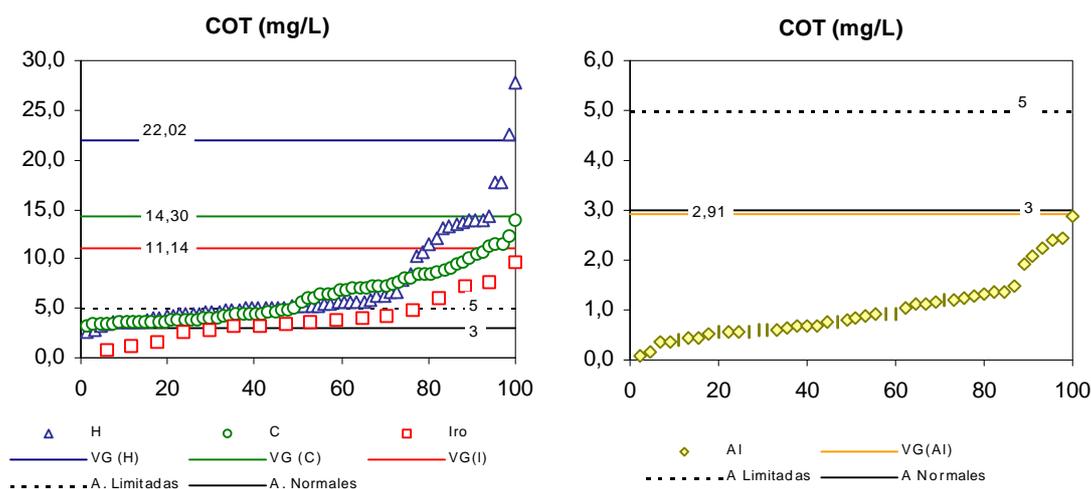
4.1.8. CARBONO ORGÁNICO

El *carbono orgánico* es el parámetro indicador de contaminación orgánica en agua de mar. Los niveles guía de calidad ambiental de *carbono orgánico disuelto* obtenidos en las áreas litorales de estudio son los siguientes:

Tabla C IV.12. Niveles guía de calidad ambiental del parámetro *carbono orgánico disuelto* en las áreas litorales de estudio

| Carbono orgánico (mg/L C) | Número de casos válidos | Media (m) | Desviación típica (s) | Nivel guía de calidad ambiental (m + 3s) |
|----------------------------|-------------------------|-----------|-----------------------|--|
| Ría de Huelva | 66 | 7,35 | 4,89 | 22,02 |
| Bahía de Cádiz | 67 | 6,26 | 2,68 | 14,30 |
| Río Iro | 15 | 4,53 | 2,21 | 11,14 |
| Bahía de Algeciras | 45 | 1,01 | 0,63 | 2,91 |
| Golfo de Cádiz | 180 | 5,29 | 4,30 | 18,18 |

Aguas Especiales, 2 mg/L; Aguas Limitadas, 5 mg/L; Aguas Normales y Aguas menos limitadas: 3 mg/L C



Los histogramas de frecuencia para este parámetro no toman una forma tan clara como para otros parámetros. En general se observan distribuciones lognormales excepto para el río Iro en el cual la forma de la distribución se aproxima más bien a una distribución normal. De cualquier forma, las altas desviaciones típicas condicionan el resultado del valor guía determinando concentraciones elevadas

respecto a los valores medios. El valor más exigente lo establece la Bahía de Algeciras determinando un nivel guía mucho más exigente que el resto de áreas ambientales. El valor más permisible lo determina la Ría de Huelva. Este valor es seleccionado como el criterio de calidad general para el Golfo de Cádiz.

Respecto a los objetivos de calidad, se puede comprobar que los niveles vigentes son completamente inadecuados para el control del contenido en carbono orgánico de las áreas litorales. Por tanto, se recomienda modificar este objetivo de calidad en la dirección de los niveles naturales. Sólo la Bahía de Algeciras cumple con los objetivos vigentes mientras que el resto de las áreas litorales presentan porcentajes muy bajos de observaciones por debajo de los límites legales. Estos porcentajes son especialmente críticos en las aguas de la Bahía de Cádiz. Los resultados muestran que el 0% de las observaciones, es decir ninguna muestra, cumple con los objetivos de calidad de aguas normales. En Huelva este porcentaje es del 3,8%. Ya se ha comentado anteriormente lo inadecuado que es establecer objetivos de calidad por debajo de los niveles normales de las aguas. Por tanto, se recomienda la **redefinición de los objetivos de calidad del parámetro *carbono orgánico disuelto* en la legislación vigente.**

4.2. VALORES GUÍA DE CALIDAD AMBIENTAL OBTENIDOS A PARTIR DE DATOS ECOTOXICOLÓGICOS

En el apartado de *Material y Métodos* del presente capítulo se ha explicado detenidamente el procedimiento de cálculo utilizado para la obtención de los valores guía de calidad ambiental de compuestos específicos. Este procedimiento se ha realizado con cada uno de los compuestos considerados en este estudio, obteniéndose finalmente, los valores guía de calidad ambiental que se resumen en la siguiente tabla. Las tablas de cálculo de estos valores guía se pueden consultar en los anexos específicos de cada compuesto.

Tabla C IV.13. Valor guía de calidad ambiental de los compuestos específicos

| Compuesto | Factor de Seguridad | Valor guía I | Valor guía II | Valor guía III |
|--------------------------|----------------------------|---------------------|----------------------|-----------------------|
| LAS (mg/L) | FS=100 | 0,0375 | 0,0138 | 0,0144 |
| | FS=20 | 0,1876 | 0,0692 | 0,0438 |
| | FS=10 | 0,3752 | 0,1384 | 0,0876 |
| NP9EO (mg/L) | FS=100 | 0,0400 | 0,0157 | 0,0472 |
| | FS=20 | 0,2002 | 0,0786 | 0,0863 |
| | FS=10 | 0,4003 | 0,1572 | 0,1726 |
| Fenol (mg/L) | FS=100 | 0,8360 | 0,7699 | 0,7222 |
| | FS=20 | 4,1802 | 3,8495 | 3,6110 |
| | FS=10 | 8,3604 | 7,6989 | 7,2219 |
| Lindano (mg/L) | FS=100 | 0,0213 | 0,0077 | 0,0086 |
| | FS=20 | 0,1062 | 0,0387 | 0,0412 |
| | FS=10 | 0,2124 | 0,0774 | 0,0824 |
| Cobre (mg/L) | FS=100 | 0,0072 | 0,0093 | 0,0090 |
| | FS=20 | 0,0357 | 0,0271 | 0,0132 |
| | FS=10 | 0,0713 | 0,0543 | 0,0263 |
| Cadmio (mg/L) | FS=100 | 0,0017 | 0,0024 | 0,0224 |
| | FS=20 | 0,0089 | 0,0093 | 0,0241 |
| | FS=10 | 0,0178 | 0,0185 | 0,0481 |
| Zinc (mg/L) | FS=100 | 0,2170 | 0,0070 | 0,0690 |
| | FS=20 | 1,0851 | 0,0352 | 0,3448 |
| | FS=10 | 2,1702 | 0,0703 | 0,6897 |

Valor Guía I: Valor Guía obtenido a partir de los resultados ecotoxicológicos de este estudio. Especies residentes.

Valor Guía II: Valor Guía obtenido a partir del conjunto de resultados ecotoxicológicos en agua de mar.

Valor Guía III: Valor Guía obtenido a partir del conjunto de datos de toxicidad en agua

Como se puede comprobar se han obtenido tres valores guía diferentes en función de los datos utilizados, para tres niveles de protección distintos. El mayor nivel de protección lo determina el factor de 100. Los factores 20 y 10 aseguran un nivel de protección adecuado y contrastado con datos de campo según CCME (1991).

Algunos de estos valores guía se han comparado con concentraciones medidas en el agua y en caso de existir, con los valores máximos permisibles en agua según la normativa andaluza de calidad de aguas litorales (BOJA, 1997). Antes de proceder a comentar los resultados, se muestra la tabla resumen de objetivos de calidad:

Tabla C IV.14. Objetivos de calidad de aguas litorales andaluzas (Orden 14.02.1997)

| | Unidades | Aguas Especiales | Aguas Limitadas | Aguas Normales | Aguas Menos Limitadas |
|----------------------|----------|------------------|-----------------|----------------|-----------------------|
| Detergentes | mg/L | 0,100 | 0,300 | 0,200 | 0,200 |
| Fenoles | mg/L | 0,020 | 0,050 | 0,030 | 0,030 |
| Hexaclorociclohexano | ng/L | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Cobre | mg/L | 0,020 | 0,040 | 0,020 | 0,020 |
| Cadmio | mg/L | 0,0025 | 0,005 | 0,0025 | 0,0025 |
| Zinc | mg/L | 0,060 | 0,080 | 0,060 | 0,060 |

4.2.1. RESULTADOS COMPARADOS DE LOS VALORES GUÍA I, II Y III

El procedimiento descrito ha permitido obtener tres valores guía en función del tipo de información utilizada. El *valor guía* I se ha obtenido a partir de los resultados obtenidos en este estudio, es decir, los datos de toxicidad utilizados pertenecen exclusivamente a especies del medio marino, y más aún, a especies residentes en el Golfo de Cádiz. El *valor guía* II se ha obtenido a partir del conjunto de datos de toxicidad en el medio marino, es decir, considera los datos de toxicidad del presente estudio, más los obtenidos a partir de la bibliografía científica. Finalmente, y puesto que en la bibliografía predominan con gran diferencia, los resultados de toxicidad de los compuestos en especies de agua dulce, se ha calculado un *valor guía* III a partir de todo el conjunto de resultados toxicológicos (especies de agua de mar y agua dulce).

Respecto a estos tres *valores guía*, a priori puede pensarse a medida que se aumente el número de datos en el base, cada vez se obtendrán valores más pequeños de *valor guía*, puesto que los nuevos valores entran en juego bien directamente, en caso de que sean concentraciones más sensibles, o indirectamente puesto que al modificarse el número de datos del taxón en cuestión, se modifica el peso del la concentración representativa de toxicidad de este taxón en el cómputo del *valor guía*. Observando los valores de la tabla se comprueba que esto no ocurre así debido a que es muy importante el número de taxones o grupos de organismos que entran en juego. Para el *valor guía* I sólo se han utilizado un máximo de tres taxones. Para el *valor guía* II siempre el número de taxones va a ser igual o superior que para para el *valor guía* I, y para el *valor guía* III el número va a ser igual o superior que para el *valor guía* II. El considerar cada vez una base de datos mayor presenta la ventaja de que es posible introducir en el sistema de cálculo, valores de toxicidad más sensibles de un taxón ya presente, pero presenta el "inconveniente" de que estamos introduciendo taxones nuevos con niveles de sensibilidad diferentes y por tanto, pueden aumentar los niveles guía.

Realmente sería muy difícil discernir si esto último representa un inconveniente o una ventaja puesto que desde el punto de vista del procedimiento, cuanto mayor sea el número de taxones, más representativo será el *valor guía* para la comunidad acuático, por lo tanto, debería considerarse como una ventaja. Sin embargo, ya se ha podido comprobar que puede aumentar el valor numérico del criterio de calidad.

En este sentido, la Directiva Marco de Aguas no aporta ninguna aclaración acerca de qué debe hacerse en estos casos. Con el resto de procedimientos, hay situaciones diversas. Algunos procedimientos consideran exclusivamente el valor correspondiente al organismo más sensible ensayado, por tanto pueden estar obteniendo un valor excesivamente sobreproteccionista en el medio acuático, puesto que puede introducirse en el procedimiento de cálculo un valor puntual excesivamente sensible. Este sería el caso del procedimiento del CCME (CCME, 1991). Respecto al procedimiento utilizado por la USEPA (USEPA, 1986) ya se ha comentado anteriormente que utiliza consideraciones estadísticas del conjunto de datos. Por tanto, valores muy elevados o poco sensibles no entran directamente en "juego", y un valor anómalo excesivamente sensible quedaría por debajo de la concentración que representa el 0,5% de probabilidad, y por tanto la concentración a partir de la cual se determina el FAV.

En definitiva, es difícil adoptar una postura acerca de si se deben excluir algunos resultados toxicológicos o no, puesto que podrían cometerse errores en ambos sentidos. Si bien a este respecto, las organizaciones internacionales, la propia Directiva Marco, y las normativas relativas a calidad de aguas, se orientan siempre más hacia la sobreprotección (USEPA, 1986; Laws, 1993; MacDonald, 1995; DOCE, 2000).

Realmente, los criterios de calidad ambiental representativos del medio marino son los Valores Guía I y II, por tanto, se centrarán las discusiones en estos dos.

4.2.2. COMPARACIÓN DE LOS NIVELES GUÍA I Y II CON CONCENTRACIONES MEDIDAS EN EL AGUA Y OBJETIVOS DE CALIDAD

En este estudio no se ha realizado el control ambiental de cada uno de los compuestos específicos considerados en los ensayos de toxicidad. Por tanto, estos comentarios quedan restringidos a los metales pesados y a los compuestos LAS y Fenol.

Respecto a los objetivos de calidad de aguas andaluzas, éstos fueron seleccionados a partir de objetivos de calidad incluidos en otras legislaciones (p.e. aguas de baño), y en otro tipo de información diversa no relacionada con resultados ecotoxicológicos. Por tanto, los diferentes niveles guía obtenidos se han comparado con estos objetivos de calidad al objeto de determinar si son adecuados para la protección del medio marino.

LAS

Respecto al LAS, las mediciones realizadas en el laboratorio al objeto de caracterizar el contenido global de compuestos tensioactivos aniónicos, es decir, las concentraciones máximas que se determinaron en las aguas de la ría de Huelva y Bahía de Cádiz no superaron en ninguno de los casos 100 µg/L de sustancias que reaccionan al azul de metileno entre las cuales se encuentra fundamentalmente el LAS. Los valores guía I y II obtenidos a partir del factor de 10 sobrepasan las concentraciones medidas en el agua, siendo más adecuado los niveles que establece el factor de 20 y 100. Es de resaltar que el *valor guía I* de FS=20 es superior a estas concentraciones, y por tanto, permitiría una cierta flexibilidad en las concentraciones de LAS en el medio.

Los objetivos de calidad de aguas litorales andaluzas para el parámetro *detergentes* establece las siguientes concentraciones máximas admisibles en las aguas: para *aguas limitadas* 300 µg/L y para *aguas normales* 200 µg/L. Estos niveles se encuentran en torno a los niveles guía calculados y por lo tanto, aseguran un adecuado nivel de protección en las aguas. Además, hay que señalar que los niveles medidos en aguas de Cádiz y Huelva no superaron en ningún caso, el límite legal establecido.

NP9EO

En relación a estos compuestos, y en general a la familia de los nonilfenoles, actualmente no existe normativa europea referente al control de estos compuestos en aguas marinas, si bien, es uno de los grupos de sustancias susceptibles de ser incluidas próximamente en la lista de sustancias prioritarias para el control de la contaminación de aguas marinas. Por tanto, no se pueden comparar los niveles guía obtenidos con normas de calidad ambiental.

Puesto que no es un parámetro sujeto a vigilancia mediante normativa, no suele incluirse en los programas de seguimiento ambiental en aguas litorales, por lo que no se dispone de niveles ambientales de referencia

FENOL

Respecto al fenol, las mediciones realizadas en el laboratorio no detectaron fenol en las aguas salvo en uno de los muestreos realizados en H2 y H3 en Huelva en el cual se determinaron niveles de fenol no superiores a los 100 µg/L. Este fue un caso muy puntual asociado con un vertido de este compuesto en las aguas e identificado por personal de vigilancia ambiental de la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía.

Los valores guía obtenidos incluso con el factor de 100 son muy superiores a las concentraciones medidas en agua.

Para el fenol, las normativas son mucho más estrictas que los valores guía obtenidos. Para aguas litorales andaluzas se establecen concentraciones máximas en las aguas de 50 µg/L en aguas limitadas y de 30 µg/L en aguas normales. Otras referencias normativas son las que establecen las normas de calidad de aguas de baño determinando un valor imperativo en las aguas destinadas al baño y actividades recreativas en 50 µg/L (RD 734/1988; BOE, 1988). Evidentemente, el valor que fija esta norma está por encima de cualquier aproximación que se haga a los niveles de calidad para la vida acuática puesto que establece normas de protección para la salud humana, y por extensión, a las comunidades biológicas.

LINDANO

El lindano, o γ -hexaclorociclohexano, es una de las sustancias "clásicas" prioritarias que deben controlarse en las aguas. Su amplio uso en agricultura como pesticida ha promovido un gran control de este compuesto en las aguas en el marco de la Unión Europea, y por tanto, los objetivos de calidad de este compuesto están muy consolidados. La normativa andaluza adoptó estos objetivos al objeto de incluir este parámetro en el control de la totalidad de las aguas litorales del territorio andaluz. Este nivel está fijado en 20 ng/L para todas las aguas.

Los valores guía obtenidos a partir de los estudios ecotoxicológicos realizados y los datos bibliográficos muestran niveles de concentración muy superiores al establecido por las normativas. En general, los objetivos de calidad de las sustancias prioritarias están basados en resultados de toxicidad en mamíferos de laboratorio, irritabilidad en la piel, etc., siendo bastante escaso el número de estudios ecotoxicológicos realizados previamente a la aprobación de estas normas (Rand, 1995; Garrido, 1997). De cualquier forma, los niveles legales aseguran un alto nivel de protección para la vida acuática.

COBRE

En los muestreos realizados en la Bahía de Cádiz y ría de Huelva, el Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz realizó el control en las aguas y sedimento de este compuesto y del resto de metales pesados. En el *Capítulo II* del presente documento puede consultarse la estadística descriptiva de estos resultados (Tablas C II.28 y C II.45). Para el cobre se obtienen valores promedios en la Bahía de Cádiz de 0,003 mg/L Cu (II) y de 0,034 mg/L Cu (II) en la Ría de Huelva. Calculando los niveles guía en función de los niveles de fondo se obtiene 0,010 mg/L en Cádiz y 0,079 mg/L en Huelva. Comparando estos resultados con los valores guía I y II se obtiene que los valores guía calculados con el factor de 10 aseguran la protección de la vida acuática y además, estos valores están en consonancia con los niveles de fondo de este metal en las áreas litorales de Cádiz y Huelva. Para Cádiz es válido incluso el *valor guía* obtenidos a partir del factor de 20.

Respecto a los objetivos de calidad en aguas andaluzas, las *aguas limitadas* permiten concentraciones de cobre inferiores a 40 µg/L y las *aguas normales*, 20 µg/L. Si bien la Bahía de Cádiz cumple con estas normas de calidad, los niveles de fondo de la Ría de Huelva superan estos límites, y como ya se ha comentado en el apartado correspondiente a los niveles guía en función de los niveles de fondo, no es

una buena estrategia establecer objetivos de calidad ambiental por debajo de los niveles normales en las aguas. En el caso de la Ría de Huelva y el contenido de metales pesados en agua y sedimento, debe realizarse una consideración especial a los niveles de fondo debido a la intensidad y a la tradición histórica que tiene la industria minera e industrial en el entorno. Por supuesto, con esto no se está diciendo que haya que permitir cualquier nivel en las aguas sino que el objetivo de calidad que se aplique de forma legal debe considerar los niveles de fondo y los niveles de protección de la vida acuática.

CADMIO

Respecto a los objetivos de calidad en aguas andaluzas, las *aguas limitadas* permiten concentraciones de cadmio inferiores a 2,5 µg/L y en *aguas normales*, 5 µg/L. Estos son objetivos de calidad muy consolidados en la legislación europea porque el cadmio ha sido tradicionalmente considerado como una sustancia prioritaria en el control de la contaminación acuática. Los niveles guía I y II muestran que los objetivos de calidad están de acuerdo con los niveles de protección para la vida acuática que determinan los resultados toxicológicos.

ZINC

Respecto a los objetivos de calidad en aguas andaluzas, las *aguas limitadas* permiten concentraciones de zinc inferiores a 80 µg/L y en *aguas normales*, 60 µg/L. Los niveles guía I y II obtenidos muestran niveles de seguridad para este metal un orden de magnitud superior a los objetivos legales. La diferencia tan acusada en el resultado del *nivel guía* del zinc basado en los resultados ecotoxicológicos del presente estudio respecto al obtenido junto con otras fuentes bibliográficas hace pensar que posiblemente se estén subestimando los niveles de protección, por tanto se concluye que el *nivel guía* I del zinc no constituye un criterio de calidad ambiental adecuado para la protección de la vida acuática.

Por otra parte, los valores guía calculados a partir de los niveles de fondo del zinc en aguas son los siguientes: 0,022 mg/L en la Bahía de Cádiz y 0,518 mg/L en la Ría de Huelva. Claramente, los objetivos de calidad de aguas andaluzas para Huelva son inadecuados puesto que limitan el contenido en zinc en las aguas por debajo de las concentraciones naturales. Respecto a los valores guía I y II se comprueba que los niveles actuales no suponen un riesgo para la vida acuática.

4.2.3. EVALUACIÓN ECOTOXICOLÓGICA DE LOS COMPUESTOS

Finalmente y para terminar este apartado, se ha realizado una evaluación ecotoxicológica del conjunto de compuestos ensayados en función de los valores guía obtenidos.

La clasificación coincide tanto para el *valor* guía I como para el *II*. Así pues, **los compuestos que presentan un mayor riesgo para la vida acuática en orden descendente son: cadmio, cobre, lindano, LAS, NP9EO y fenol.**

Respecto a un factor de seguridad general de aplicación a todos los compuestos, se propone el factor de 20 puesto que es un factor intermedio y se ajusta con las concentraciones medidas de un número importante de parámetros.

5. CONCLUSIONES GLOBALES

Al tratarse este del capítulo de síntesis y aplicación de los resultados, las siguientes conclusiones podrían considerarse como las globales del trabajo de investigación realizado.

En base a la evaluación realizada de los objetivos de calidad ambiental vigentes en aguas litorales andaluzas y a los resultados fruto de la caracterización fisicoquímica de las áreas de estudio se recomienda rediseñar los objetivos de calidad vigentes en función de las concentraciones basales actuales.

Respecto a la comparación de los criterios de calidad obtenidos en base a los estudios ecotoxicológicos realizados a los compuestos específicos estudiados, y los objetivos de calidad vigentes en aguas litorales andaluzas se han obtenido las siguientes conclusiones:

- ✓ Los valores guía obtenidos para el LAS son similares a los niveles medidos en las aguas y a los objetivos de calidad vigentes en aguas limitadas y normales andaluzas. Por tanto, los valores guía calculados a partir de resultados ecotoxicológicos en el medio marino justifican los objetivos de calidad y aseguran un nivel de protección para la vida acuática.
- ✓ Al no existir actualmente niveles legales para los NP9EO, ni se tiene constancia de niveles en las aguas litorales de estudio, los valores guía de NP9EO constituyen una primera aproximación para el control de estos compuestos en agua de mar.
- ✓ Los niveles de protección para la vida acuática obtenidos para el lindano son muy superiores a los objetivos de calidad establecidos para aguas afectadas por vertidos de este compuesto. Sin embargo, el lindano es una sustancia prioritaria y presenta objetivos de calidad en aguas muy consolidados a través de Directivas Europeas. Por lo tanto, no se recomienda ninguna acción sobre los objetivos de calidad de este compuesto.
- ✓ Los niveles de protección para la vida acuática obtenidos para el fenol son muy superiores a los objetivos de calidad en aguas andaluzas y aguas de baño. Por lo tanto, los objetivos vigentes aseguran la protección de la vida acuática.
- ✓ Los objetivos de calidad de aguas andaluzas para cobre no se ajustan a los resultados obtenidos de niveles de fondo ni a los niveles de protección para la vida acuática. Por tanto, se recomienda revisar estos objetivos.
- ✓ El cadmio es una sustancia prioritaria con objetivos de calidad en aguas afectadas por vertidos muy consolidados en la legislación europea y nacional. Los niveles guía obtenidos mediante resultados ecotoxicológicos en el medio marino justifican un nivel de protección adecuado para estos objetivos de calidad.
- ✓ Respecto al zinc, se recomienda realizar más estudios con especies residentes al objeto de obtener resultados más acordes con los resultados recogidos en la bibliografía.

Finalmente, la conclusión global que se obtiene en este trabajo de investigación es que las aguas limitadas son cuerpos de aguas con morfología, hidrodinámica, presión por vertidos y acciones antropogénicas particulares y específicas, y por tanto, la mejor estrategia para una correcta evaluación de la calidad de estos cuerpos de agua y el control de la contaminación, es tratar a estos sistemas desde la particularidad y no desde la generalidad. Si bien las normativas de calidad de aguas proporcionan un nivel base de protección, una vez éstas definidas es preciso obtener los criterios de calidad ambiental (niveles guía y normas químicas) en base a las particularidades de cada área limitada del litoral. Las estrategias a seguir son la determinación de criterios de calidad ambiental en función de los niveles de fondo de los compuestos en el medio natural, y en función de criterios ecotoxicológicos. En relación con estos últimos, es necesario orientar los ensayos estándares a condiciones más reales al objeto de obtener un óptimo nivel de protección en función de las normas obtenidas a partir de los resultados ecotoxicológicos, para ello es preciso ensayar la ecotoxicidad con especies autóctonas o residentes en estas aguas, y considerar como variable de ensayo, las condiciones naturales de estos cuerpos de agua (nutrientes, contenido de compuestos contaminantes, etc.).

BIBLIOGRAFÍA

- BIBLIOGRAFÍA CITADA
- LEGISLACIÓN CONSULTADA

BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Abassi, S.A.; Nipanay, P.C.; Soni, R. (1988). Studies on environmental management of mercury (II), chromium (VI) and zinc (II) with respect to the impact on some arthropods and protozoans. Toxicity of zinc (II). *International Journal of Environmental Studies*, 32: 181-187.
- Abel, P.D.; Axiak, V. (1991). *Ecotoxicology and the marine environment*. Ellis Horwood, England.
- Acevedo, A. (2001). Caracterización microbiológica del río Iro. Efecto de la estación depuradora "El Torno". Tesis de Licenciatura. Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Universidad de Cádiz.
- Adams, M.J. (1998). The principles of multivariate data analysis. En: *Analytical Methods of Food Authentication*, eds. P.R. Ashurst and M.J. Dennis. Blackie Academic Professional, London, UK.
- AFS. (1991). Common and scientific names of fishes of the United States and Canada. Special Publ. 20, American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Aguayo, S.; Roset, J.; de la Torre, A.I.; Cuellar, M.L.; Muñoz, M.J. (2000). Ensayos de ecotoxicidad minituarizado en *Chlorella vulgaris* utilizando diferentes parámetros de expresión. *Revista de Toxicología*, (2000) 17: 41-45.
- Amat, F. (1985). Biología de la Artemia. Informe Técnico del Instituto de Investigaciones Pesqueras, 126-127.
- Anazawa, K.; Ohmori, H. (2001). Chemistry of surface water at a volcanic summit area, Norikura, Central Japan: Multivariate statistical approach. *Chemosphere*, 45: 807-816.
- Anderson, B.S. y Hunt, J.W.: Bioassay methods for evaluating the toxicity of heavy metals, biocides and sewage effluents using microcopic stages of giant kelp *Marcocytis pyrifera* (Agargh). A preliminary report. *Marine Environmental Resource*, 26: 113-134.
- ANZECC (1993). *Asutralian Water Quality Guidelines*. Australian and New Zealand Environment and Conservation Council.
- APHA-AWWA-WPCF (American Public Health Association Water Works Association and Water Pollution Control Federation (1989). *Métodos normalizados para el análisis de aguas potables, natural y residuales*. Washington, DC.
- APHA-AWWA-WPCF (American Public Health Association Water Works Association and Water Pollution Control Federation (1992). *Standard Methods for the examination of water and wastewater*. 18th ed. Washington, DC.
- ASTM (1990). *Standard guide for conducting static 96-h toxicity tests with microalgae*. E1218-90. Philadelphia.
- ASTM (1990). *Standard guide for conducting static 96-h toxicity tests on hazardous chemical wastes using the freshwater green alga, *Selenastrum capricornotum* (Draft)*. Philadelphia.
- ASTM (American Society for Testing and Materials) (1993). *Annual Book of ASTM Standards*.
- BCMOE (British Columbia Ministry of Environment) (1989). *Developing criteria and objectives for managing contaminated sites in British Columbia*. Draft Report 9, Waste Management Branch, Ministry of Environment. Victoria, British Columbia.
- BCMOE (British Columbia Ministry of the Environment) (1986). *Principles for preparing water quality objectives in British Columbia*. Resource Quality Section. Water Management Branch. Victoria, British Columbia.
- BCMOELP (1995). *The British Columbia water quality index*. Water Quality Branch, Environmental Protection Department, British Columbia Ministry of Environment, Lands and Parks, Victoria, B.C.
- Benenati, F. (1990). Keynote address: plants –keystone to risk assessment. *Plants for toxicity assessment*, ASTM STP 1091. Philadelphia, American Society for Testing and Materials.
- Benito de Santos, G.; Figueras Comas, M. (1996). Índices analíticos biológicos y fisico-químicos de calidad de aguas. Su relación en las aguas del río Muga. *Tecnología del Agua*, 150: 22-32.
- Blaise, C.B. (1991). Microbiotest in aquatic ecotoxicology: characteristics, utility and prospects. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 6: 145-155.
- Blaise, C.B.; Legault, R.; Bermingham, N.; Coillie, R.V.; Vasseur, P. (1986). A simple algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Toxicity assessment*, 1: 261-281.
- Blanck, H.; Bjornsater, B (1989). *The algal microtest battery –a manual for routine tests of growth inhibition*. KEMI Report N° 3198. Goteborg: The Swedish National Chemicals Inspectorate.
- Bolton, P.W.; Currie, J.C.; Tervet, D.J.; Welsh, W.T. (1978). An index to improve water quality classification. *Water Pollution Control*, 77 (2): 271-280.
- Boyle, T.P. (Ed.) (1984). *The effects of environmental contaminants on aquatic algae. Algae as ecological indicators*. Academic Press, New York.

- Boyle, T.P. (Ed.) (1985). Validation and predictability of laboratory methods for assessing the fate and effects of contaminants in aquatic algae. *Algae as ecological indicators*, edited by L.E. Shubert, pp. 237-256. New York: Academic Press.
- Breidt, F.J., D.C. Boes, J.I. Wagner, and M.D. Flora (1991). Antidegradation water quality criteria for the Delaware River: A distribution-free statistical approach. *Wat. Resour. Bull.* 27(5):849-858.
- British Columbia Minister of Environment Lands and Parks (BCMOELP) (1995). The British Columbia water quality index. Water Quality Branch, Environmental Protection Department, BCMOELP, Victoria, B.C.
- Brown, S.D.; Blank, T.B.; Sum, S.T.; Weyer, L.G. (1994). *Chemometr. Anal. Chem.* 66: 315-359.
- Bruijn, J.H.M.; Van Leeuwen, C.J. (1996). No-effect concentration in environmental policy. En: *The analysis of aquatic toxicity data*. S.A.L.M. Kooijman y J.J.M. Bedaux (ed.). VU University Press, Amsterdam.
- Cairns, J. (1983). Are single species toxicity tests alone adequate for estimating environmental hazard?. *Hydrobiology* 100: 47-57.
- Canfield, T.J.; Kemble, N.L.; Brumbaugh, W.G., Qwyer, F.J., Ingersoll, C.G., Fairchild, J.F. (1994). Use of benthic invertebrate community structure and the sediment quality triad to evaluate metal-contaminated sediment in the upper Clark Fork River. *Montana. Environmental Toxicology and Chemistry*, 13: 1999-2012.
- Carlson, R.; Brungs, W.; Chapman, G.; Hansen, D. (1985). Guidelines for deriving numerical aquatic site-specific water quality criteria by modifying national criteria. Environmental Protection Agency, Duluth, MS.
- CCE (Comisión de las Comunidades Europeas) (1996). Communication from the Commission to the Council and the European Parliament. *European Community Water Policy*. Bruselas, 21.02.1996, COM(96) 59 final.
- CCM (2000). Propuesta de Decisión del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. COM (2000). 2000/0035 (COD). Bruselas.
- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment) (1993). Proposed protocols for the derivation of water quality guidelines for the protection of agricultural water uses. Eco-Health Branch. Environment Canada. Ottawa, Ontario.
- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). (1991). Interim Canadian environmental quality criteria for contaminated sites. Prepared by Angus Environmental Limited. Don Mills, Ontario. Prepared for Canadian Council of Ministers of the Environment Subcommittee on Environmental Quality Criteria for Contaminated Sites. Ottawa, Ontario. 22 pp.
- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment). (1991). A protocol for the derivation of water quality guidelines for the protection of aquatic life. In: *Canadian Water Quality Guidelines: Appendix IX*. Prepared by the Task Force on Water Quality Guidelines of the Canadian Council of Ministers of the Environment. Water Quality Branch. Environment Canada. Ottawa, Canada. 24 pp.
- CCREM (Canadian Council of Resource and Environment Ministers) (1987). Canadian water quality guidelines. Task Force on Water Quality Guidelines. Ottawa, Canada. (This document includes updates to February 28, 1994).
- Chapman, D. (1992). *Water Quality Assessment*, ed. D. Chapman on behalf of UNESCO, WHO and UNEP. Chapman & Hall, London.
- Chapman, P.M. (1986). Sediment quality criteria from the sediment quality triad –an example. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5: 957-964.
- Chapman, P.M. (1990). The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *Science and Total Environment*, 97: 815-825.
- Chapman, P.M.; Caldwell, R.D.; Chapman, P.F. (1996). A warning: NOECs are inappropriate for regulatory use. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15: 77-79.
- Chapman, P.M.; Dexter, R.N.; Anderson, H.B; Power, E.A. (1991). Evaluations of effects associated with an oil platform using the sediment quality triad. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10: 407-424.
- Chapman, P.M.; Dexter, R.N.; Long, E.R. (1987). Synoptic measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition (the Sediment Quality Triad) in San Francisco Bay. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 37: 75-96.
- Chapman, P.M.; Paine, M.D.; Arthur, A.D.; Taylor, L.A. (1996). A trial study of sediment quality associated with a major, relatively untreated marine sewage discharge. *Marine Pollution Bulletin*, 32: 47-64.
- Chapman, P.M.; Power, E.A.; Burton, G.A. (1992). Chapter 14. Integrative assessments in aquatic ecosystems. En: *Contaminated Sediment Toxicity Assessment* (G.A. Burton ed.), 313-340. Lewis Publishers, Inc. Boca Raton, Florida.
- Chapman, P.M. (1990). The sediment quality triad approach to determining pollution-induced degradation. *Science and the Total Environment*, 97-8: 815-825.
- Chen, G.N. (1993). Assessment of environmental water with fuzzy cluster analysis and fuzzy recognition. *Anal. Chim. Acta*, 271: 115-124.
- Cheung, K.C.; Chu, L.M.; Wong, M.H. (1993). Toxic effect of landfill leachate on microalgae. *Water, Air, Soil Pollution*, 69: 337-349.

- Chiacchio, U.; Librando, V.; Magazzu, G. (1997). Monitoring studies of Augusta Bay marine waters. *Environmental Monitoring Assessment*, 44: 383-390.
- Clement, B.; Janssen, R.C.; Le Dû-Delepierre, A. (1997). Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. 2. Comparación of physico-chemical characteristics of landfill leachates with their toxicity determined with a battery of tests. *Chemosphere*, 35 (11): 2783-2796.
- Clement, B.; Persoone, G.; Jansen, C.; Le Dû-Delepierre, A. (1996). Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. 1. Determination of leachate toxicity with a battery of acute tests. *Chemosphere*, 33 (11): 2303-2320.
- CMAA (2000). Corredor Verde del Guadiamar. Secretaría General Técnica. Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía.
- Comisión de las Comunidades Europeas (2001). Comunicación de la Comisión al Consejo, al Parlamento Europeo, al Comité Científico y Social y al Comité de las Regiones, sobre el Sexto Programa de Acción de la Comunidad Europea en materia de Medio Ambiente. Medio Ambiente 2010: el futuro está en nuestras manos. COM (2001) 31 final. 2001/0029 (COD).
- Conover, W.J. (1980). *Practical Nonparametric Statistics*. Second edition. John Wiley and Sons, New York, NY. pp. 466-467.
- Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (CMA) (1989). Medio ambiente en Andalucía, Informe 1989. Sevilla.
- Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (CMA) (1991). Medio ambiente en Andalucía, Informe 1991. Sevilla.
- Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (CMA) (1992). Medio ambiente en Andalucía, Informe 1992. Sevilla.
- Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (CMA) (1993). Medio ambiente en Andalucía, Informe 1993. Sevilla.
- Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (CMA) (1994). Medio ambiente en Andalucía, Informe 1994. Sevilla.
- Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (CMA) (1995). Medio ambiente en Andalucía, Informe 1995. Sevilla.
- Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (CMA) (1995). Plan de Medio Ambiente de Andalucía 1995/2000. Documento I: Análisis de Situación, Metas, Estrategia y Objetivos Generales. Sevilla.
- Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (CMA) (1996). Inventario de vertidos líquidos al litoral de Andalucía. Sevilla.
- Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (CMA) (1996). Medio ambiente en Andalucía, Informe 1996. Sevilla.
- Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (CMA) (1997). Medio ambiente en Andalucía, Informe 1997. Sevilla.
- Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (CMA) (1998). Medio ambiente en Andalucía, Informe 1998. Sevilla.
- Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (CMA) (1999). Medio ambiente en Andalucía, Informe 1999. Sevilla.
- Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (CMA) (2000). Medio ambiente en Andalucía, Informe 2000. Sevilla.
- Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (CMA) (2001). Medio ambiente en Andalucía, Informe 2001. Sevilla.
- Consejería de Medio Ambiente, Junta de Andalucía (CMA-Junta Andalucía) (2000). Evaluación de procesos ecotoxicológicos en especies acuáticas del litoral andaluz. Informe Final. (documento interno).
- Coulliard, D.; Lefebvre, Y. (1985). Analysis of water quality indices. *Journal of Environmental Management*, 21: 161-179.
- Cowgill, U.M.; Milazzo, D.P. (1989). The culturing and testing of two species of duckweed. *Aquatic toxicology and hazard assessment*, 12th Volume. ASTM, Philadelphia.
- Coya, B. (2002). Evaluación de la ecotoxicidad de residuos industriales. Tesis Doctora. Departamento de Ingeniería Química y Tecnología del Medio Ambiente. Universidad de Oviedo.
- De Pauw, N.; Persoone, G. (1988). Microalgae for aquaculture. En: *Microalgae biotechnology*. Borowitzka y Borowitzka (eds.) Cambridge University Press.
- Del Valls, T.A. (1994). Aplicación de un método integrado para la medida de la calidad ambiental en ecosistemas litorales del golfo de Cádiz. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz.

- Del Valls, T.A.; Forja, J.M.; Gómez-Parra, A. (1998). Integrative assessment of sediment quality in two littoral ecosystems from the Gulf of Cádiz, Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry*. Vol. 17 (6): 1073-1084.
- Di Toro, D.M.; Dodge, L.J. Hand, V.C. (1990). A model for anionic surfactant sorption. *Environmental Science and Technology*, 24 (7): 1013-1020.
- Dixon, W.; Chiswell, B (1996). Review of aquatic monitoring program design. *Water Research*, 30: 1935-1948.
- Dorn, P.B.; Salanitro, J.P.; Evasn, S.H.; Kravetz, L. (1993). Assessing the aquatic hazard of some branched and linear non-ionic surfactants by biodegradation and toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 12: 1751-1762.
- Dunn, G.W. (1989). An approach used to establish site-specific water quality indicators on interprovincial streams. *Proceedings of the CCME Workshop on the Development of Water Quality Objectives*. Canadian Council of Ministers of the Environment. Ottawa, Canada.
- Dunnnett, C.W. (1964). New table for multiple comparisons with a control. *Biometrics* 20:482.
- DWAF (1993). Department of Water Affairs & Forestry. South African National Water Quality Guidelines. Vol. 1-4. Pretoria.
- EC (1996). Technical Guidance Document in support of Commission Directive 96/67/EEC on risk assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) N°1488/94 on risk assessment for existing substances. Office for official Publications of the European Communities, Luxembourg.
- ECETOC (1993). Technical report N° 56. Aquatic toxicity data evaluation. Appendix C: The database. ECETOC, Brussels, Belgium.
- ECETOC (2001). Technical report N° 82. Risk assessment in marine environments. ECETOC, Brussels, Belgium.
- EEC (Comunidad Económica Europea) (1987). Methods for the determination of ecotoxicity: algal inhibition test. Directive 79/831.
- Efron, B. (1979). *Bootstrap* methods: another look at the jackknife. *The Annals of statistics*, 7: 1-2.
- Efron, B.; Tibshirani, R.J. (1986). *Bootstrap* methods for standard errors, confidence intervals, and other measures on statistical accuracy. *Statistical Science*, Vol. 1 (1): 54-77.
- Efron, B.; Tibshirani, R.J. (1993). *An introduction to the bootstrap*. Nueva York, Chapman & Hall.
- Environment Canada (1990). Biological Test Methods: Reference method for determining acute lethality of effluents to *Daphnia magna* Report EPS 1/RM/21. Environment Canada, Conservation and Protection, Ottawa, Ontario, Canada.
- Environment Canada (1992). Biological Test Methods. Environment Canada, Conservation and Protection, Ottawa, Ontario, Canada.
- Environmental Canada (2001). Canadian Environment Protection Act., 1999. Priority substances list assessment report: Nonylphenol and its ethoxilates. Environment Canada, Health Canada.
- FDA (Food and Drug Administration) (1987). Algal assay test. Environmental Assessment Technical Guide. Washington, DC.
- Fernández, A.; Tejedor, C.; Cabrera, F.; Chordi, A. (1995). Assessment of toxicity of river water and effluents by the bioluminescence assay using *Photobacterium phosphoreum*. *Water Research*, Vol. 29 (5): 1281-1286.
- Fernández-Piñas, F.; Mateo, P.; Bonilla, L. (1991). Binding of cadmium by cyano bacterial growth media: free ion concentration as a toxicity index to the cyanobacterium *Nostoc VAM 208*. *Archieve of Environmental Contamination and Toxicology*, 21: 425-431.
- Finney, D.J. 1971. *Probit Analysis*. Third Edition. Cambridge Press, New York, NY.
- Freemark, K.; McQuarrie, P.; Swanson, S.; Peterson, H.; (1990). Development of guidelines for testing pesticide toxicity to nontarget plants for Canada. *Plants for toxicity assessment*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.
- Garrido M.C.; M.A. González; J.B. Ortiz; M.C. Piñuela; M.C. Sarasquete; M.L. González; E. Nebot; D. Sales (2000). Deriving site-specific water quality criteria for lindane in andalusian littoral waters. En: *Third Setac World Congress: Global Environmental Issues In The 21st Century: Problems, Causes And Solutions*. Brighton, UK.
- Garrido M.C.; M.A. González; J.B. Ortiz; R.Rodríguez; M.C. Piñuela; M.L. González; E. Nebot; D. Sales (2000). Identifying Environmental Toxicity Areas in the Gulf of Cadiz (Southwest Spain). En: *Third Setac World Congress: Global Environmental Issues In The 21st Century: Problems, Causes And Solutions*. Brighton, UK.
- Garrido Pérez, M.C. (1997). Propuesta acerca de los objetivos de calidad de las aguas del litoral andaluz. Tesis de Licenciatura. Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Universidad de Cádiz.
- Garrido, C.; Nebot, E.; Sales, D. (2001). Use of the USEPA method for estimating the chronic toxicity of receiving waters to evaluate the environmental quality of sensible waters in the Southwest of Spain. 11th Annual Meeting of Setac Europe: From Basic Science to Decision-Making: "The Environmental Odyssey". Madrid.

- Garrido, M.C. (1997). Propuesta cerca de los objetivos de calidad de las aguas del litoral andaluz. Tesis de licenciatura. Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Universidad de Cádiz.
- Garrido-Pérez, M.C.; Acevedo-Merino, A.; Nebot-Sanz, E.; Sales-Márquez, D. (2002). A set of marine microalgae bioassays for the evaluation of biological water quality in enclosures areas in south of Spain. Dept. Chemical Engineering, Food Technologies and Environmental Technologies. Faculty of Marine and Environmental Sciences ENVIRO 2002/IWA World Water Congress. Melbourne, Australia.
- Gaudette, H.E.; Flight, W.R.; Toner, L.; Folger, D.W. (1974). An inexpensive titration method for the determination of organic carbon in recent sediments. *J. Sediment. Petrol.* 44: 249-253.
- Gazzella L. (1995). Toxicity Test with *Vibrio Fischeri* bioluminescent bacteria. *Analytical Methods.* IRSA-CNR, 1-8 pp.
- Giesy, J.P.; Hoke, R.A. (1989). Freshwater sediment quality criteria: toxicity bioassessment. *Sediments: Chemistry and Toxicity of in-Place Pollutants.* Lewis, Chelsea, MI.
- Gilliom, R.J.; Helsel, D.R., (1986). Estimation of distributional parameters for censored trace level water quality data, Part 1. Estimation techniques: *Water Resources Research*, Vol. 22: 135-146.
- Gilliom, R.J.; Helsel, D.R. (1986). Estimation of distributional parameters for censored traced level water quality data. I: Estimation techniques. *Water Resources Research*, 22: 135-146.
- González del Valle, M.A. (1997). Caracterización y crecimiento de las poblaciones bacterianas asociadas a cultivos de microalgas marinas. Producción de compuestos de potencial interés. Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- Graça, M.A.S.; Coimbra, C.N. (1998). The elaboration of indices to assess biological water quality. A case study. *Water Research*, 32: 380-392.
- Granados, J. (1996). Surfactants raw materials. Constant evolution and a solid future. 4th World Surfactant Congress, Vol. 1, pp: 100-123.
- Graneli, E.; Sundström, B; Edler, L.; Anderson, D.M. (1990). *Toxic marine phytoplankton.* Elsevier, New York.
- Grasshoff, W.K.; Weinheim, K.; Ehrhasrdt, M.; Krempling, K. (eds.) (1983). *Methods of seawater analysis.* Second, Revised and Extended Edition. Editorial Verlag Chemie,.
- Guillard, R.R.L.; Ryther, J.H. (1962). Studies on marine planktonic diatoms, I. *Cyclotella nana* Husted and *Dentonula confervaceae* (Cleve) Gran. *Canadian Journal of Microbiology*, 8: 229-239.
- Hakanson, L. (1994). A review of effect-dose-sensitivity models for aquatic ecosystems. *Internationale Revue der Gesamten hydrobiology*, 79: 621-667.
- Hall, J.; Healey, F.P.; Robinson, G.G.C. (1989). The interaction of chronic copper toxicity with nutrient limitation in chemostat cultures of *Chlorella*. *Aquatic Toxicology*, 14:15-26.
- Hall, L.W.; Ziegenfuss, M.C.; Anderson, R.D.; Killen, W.D.; Alden, R.W.; Adolphson, P. (1994). A pilot study for ambient toxicity testing in Chesapeake Bay –Year 3 Report. CBP/ TRS 116/94. USEPA, Annapolis, MD.
- Hall, L.W.Jr.; Alden, R.W. (1997). A review of concurrent ambient water column and sediment toxicity testing in the Chesapeake Bay watershed: 1990-1994. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 16 (8): 1606-1617.
- Hall, L.W.Jr.; Ziegenfuss, M.C.; Anderson, R.D.; Killen W.D.Jr. (1995). Use of estuarine water column tests for detecting toxic conditions in ambient areas of the Chesapeake Bay watershed. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 14 (2): 267-278.
- Hall, L.W.Jr.; Ziegenfuss, M.C.; Fischer, S.A. (1992). Ambient toxicity testing in the Chesapeake Bay watershed using freshwater and estuarine water column tests. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol. 11: 1409-1425.
- Hall, W.S.; Patoczka, J.B.; Mirenda, R.J.; Porter, B.A.; Miller, E. (1989). Acute toxicity of industrial surfactants to *Mysidopsis bahia*. *Archieve of Environmental Contamination and Toxicology*, 18: 765-772.
- Hampel, M. (2000). Toxicidad de los homólogos del lineal alquil benceno sulfonato sódico (LAS) y de su intermedio de degradación ácido sulfofenil carboxílico (SPC-C11) sobre embriones y larvas de dorada (*Sparus aurata*). Tesis de Licenciatura. Universidad de Cádiz.
- Hapke, H.J. (1981). Possibilities and limitations of ecotoxicological testing of chemicals. En: *Toxicological and Environmental Chemistry*, 3: 227-237.
- Helena, B.; Pardo, R.; Vega, M.; Barrado, E.; Fernández, J.M.; Fernández, L. (2000). Temporal evolution of groundwater composition in an alluvial aquifer (Pisuerga River, Spain) by principal component análisis. *Water Research*, 34 (3): 807-816.
- Hoekstra, J.A.; Ewijk, P.H. van (1992). Alternatives for the no-observed effect concentration. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12: 187-194.
- Holst, R.W.; Ellwanger, T.C. (1982). Pesticide assessment guidelines. Subdivision J. Hazard evaluation: Nontarget plants. EPA-54019-82-020. US. Environmental Protection Agency, Washington, DC.
- House, M.A.; Ellis, J.B. (1987). The development of water quality indices for operational management. *Water Science and Tecnology*, Vol.19 (9): 145-154.

- Huertas, I.E.; Espie, G.S.; Colman, B.; Lubián, L.M. (2000). Light-dependent bicarbonate uptake and CO₂ efflux in the marine microalgae *Nannochloropsis gaditana*. *Planta*, 211 (1): 43 - 49.
- Huertas, I.E.; Montero, O.; Lubián, L.M. (2000). Effects of dissolved inorganic carbon availability on growth, nutrient uptake and chlorophyll fluorescence of two species of marine microalgae. *Aquacultural Engineering*, 22: 181 - 197.
- Hughes, J.S.; Alexander, M.M.; Balu, K. (1988). An evaluation of appropriate expressions of toxicity in aquatic plant bioassays as demonstrated by the effects of atrazine on algae and duckweed. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment*, 10th Volume. ASTM, Philadelphia.
- Hüls, A.G. (1996). Determination of the effects of nonylphenol on the growth of *Scenedesmus subspicatus*. 86.91.SAG (algal growth inhibition test according to UBA February 1984) (Report AW-185).
- Intergovernmental Oceanographic Commission (1983). Chemical methods for use in marine environmental monitoring. Unesco
- ISO (1988). Water Quality –marine algal growth inhibition test with *Skeletonema costatum* y *Phaeodactylum tricornutum*. Netherland.
- ISO (International Organization for Standardization) (1987). Water Quality –algal growth inhibition test. N° 8692. Paris.
- Johnson, R.A.; Wichern, D.W. (1992). Applied multivariate statistical analysis, 3rd ed. Prentice-Hall International, Englewood Cliffs, New Jersey, USA.
- Joret, J.C.; Levi, Y.; Berger, R.; Nakache, F.; Gibert, M. (1986). Application du test microtox a la surveillance de la qualité des eaux destinées a la production d'eau potable. *J. Franc. D'Hydro*. 17: 143-152.
- Klemm, D.J.; Morison, G.E.; Norberg-King, T.J.; Peltier, E.H.; Heber, M.A. (1994). Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Marine and Estuarine Organisms. EPA/600/4-91/003.
- Koh, C.H.; Khim, J.S.; Villeneuve, D.L.; Kanna, K.; Giesy, J.P. (2002). Analysis of trace organic contaminants in sediment, pore water and water samples from Onsan Bay, Korea: Instrumental analysis and in vitro gene expression assay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21 (9): 1796-1803.
- Kooijman et al. (1996). No-effect concentrations in algal growth inhibition tests. *Water Research*, Vol. 30, n° 7.
- Kooijman et al. (1996). Some statistical properties of estimates of no-effect concentrations. *Water Research*, Vol. 30, n° 7.
- Kooijman, S.A.L.M.; Bedaux, J.J.M. (1996). The analysis of aquatic toxicity data. VU University Press, Amsterdam.
- Kooijman, SALM (2000). Dynamic Energy and Mass Budgets in Biological Systems. Cambridge University Press, Cambridge, Second Edition.
- Kramer, K.J.M. y Botterweg, J. (1991). Aquatic biological early warning system: an overview. In bioindicators and Environmental Management. Academic Press, New York.
- Kuang-Chung, Y.; Tsal, L.; Chen S.; Ho, S. (2001). Correlation analyses on binding behavior of heavy metals with sediment matrices. *Water Research*, 35 (10). 2417-2428.
- Kucuksezgin, F. (1996). Multivariate análisis of water quality parameters in Izmir Bay, Eastern Aegean. *Toxicology and Environmental Chemistry*, 55: 135-144.
- Lange, B. (2000). Luminescent Bacteria Test according to DIN 38 412 L 34. LUMISTox-DRLANGE Toxicity Test. Dr. Bruno Lange GmbH & Co. Dusseldorf, Germany. Manufacturer information.
- Laube, V.S.; Ramamoorthy, S.; Kushner, D.J. (1979). Mobilization and accumulation of sediment bound heavy metals by algae. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 21: 763-770.
- Lau-Wong, M.M. (1990). Assessing the effectiveness of depuration of polluted clams and mussels using the microtox bioassay. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 44: 876-883.
- Lavoie, A.; Nolauue, J (1985). Hyperconcentrated cultures of *Scenedesmus appliques*: a new approach for wastewater biological tertiary treatment. *Water Research*, 19: 1437-1442.
- Laws, E.A. (1993). Aquatic Pollution. An introductory Text. Second Edition, John Wiley & Sons, INC.
- LeBlanc, G.A. (1984). Interspecies relationships in acute toxicity of chemicals to aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3: 37-50.
- Lee, R.E. (1989). Phycology, 2nd edition. Cambridge University Press.
- Lewis et al. (1994). Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms EPA/600/4-91/002.
- Lewis, M. A.(1986) Comparison of the effects of surfactants on freshwater phytoplankton communities in experimental enclosures and on algal population growth in the laboratory. *Environ. Toxicol. Chem.* 5:319-332
- Londwehr, J.M.; Deininger, R.A. (1976). A comparison of several water quality indices. *Journal WPCF*, 48 (5): 954-958.

- Long, E.R.; Chapman, P.M. (1985). A sediment quality triad: Measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound. *Marine Pollution Bulletin*, 16: 105-115.
- Lubian, L.M. (1982). Ultraestructura y pigmentos de algunas Clorophyceae y Eustigmatophyceae planctónicas de morfología similar. *Collectanea botánica*, 13 (2): 873-880.
- Lubian, L.M. (1989). *Nannochloropsis gaditana*, sp. Nov., una nueva Eustigmatophyceae marina. *Lazaroa*, 4: 287-293.
- Lubián, L.M.; Montero, O.; Moreno-Garrido, I.; Huertas, E.; Sobrino, C.; González del Valle, M.; Parés, G. (2000). *Nannochloropsis* (Eustigmatophyceae) as a source of commercially valuable pigments. *Journal of Applied Phycology*, 12(3/5): 249-255.
- Lubián, L.M.; Yúfera, M (1989). Colección de cepas de microalgas del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía (CSIC). En: *Acuicultura intermareal*. M. Yúfera ed. Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía, Cádiz.
- MacDonald, D.D, S.L. Smith, M.P. Wong, and P. Mudroch (1992). The development of Canadian marine environmental quality guidelines. Report prepared for the Interdepartmental Working Group on Marine Environmental Quality Guidelines and the Canadian Council of Ministers of the Environment. Environment Canada. Ottawa, Canada.
- MacDonald, D.D. (1989). Development, implementation, and use of site-specific water quality objectives: A conceptual model. In: M.C. Taylor (Ed.). *Proceedings of a Workshop on the Development and Use of Water Quality Objectives*. Task Force on Water Quality Guidelines. Canadian Council of Ministers of the Environment. Ottawa, Canada.
- MacDonald, D.D. (1993). Canadian environmental quality guidelines for polychlorinated dibenzo-p-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. Prepared for Eco-Health Branch. Environment Canada. Ottawa, Ontario.
- MacDonald, D.D. (1993). Development of an approach to the assessment of sediment quality in Florida coastal waters. Prepared for Florida Department of Environmental Regulation. Tallahassee, Florida..
- MacDonald, D.D. and A. Sobolewski (1993). Recommended procedures for developing site-specific environmental quality remediation objectives for contaminated sites in Canada. Report prepared for Subcommittee on Environmental Quality Criteria for Contaminated Sites. Canadian Council of Ministers of the Environment. Ottawa, Canada.
- MacDonald, D.D. and S.L. Smith (1990). A strategy approach to the development and implementation of environmental quality objectives in the territorial portion of the Slave River Basin. Report prepared for the Water Resources Division, Indian and Northern Affairs Canada. Yellowknife, Northwest Territories.
- MacDonald, D.D., L.E. Fidler, and D. Valiela (1987). Site-specific water quality criteria for fish and aquatic life in the Canadian portion of the Flathead River basin: Nitrate, nitrite, and ammonia. Water Quality Branch. Environment Canada. Vancouver, British Columbia.
- MacDonald, D.D., W.T. Willingham, L.P. Parrish, G.J. Rodriguez, J.M. Lazorchak, and J.W. Lowe (1989). Using in situ bioassays as a basis for the development of water quality objectives: A case study of the Arkansas River. In: M.C. Taylor (Ed.). *Proceedings of a Workshop on the Development and Use of Water Quality Objectives*. Task Force on Water Quality Guidelines. Canadian Council of Ministers of the Environment. Ottawa, Canada.
- MacDonald, G.G. (1994). A review of environmental quality criteria and guidelines for priority substances in the River Fraser Basin. Environment Canada, British Columbia.
- Macek, K. J. y Krzeminski, K. H.(1975). Susceptibility of Bluegill sunfish (*Lepomis macrochirus*) to non-ionic surfactants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 13:377-384
- MacKay, H.M; Roux, D.J.; Ashton, P.J.; van Vliet, H.R.; Jooste, S. (1995). The development of South African Water Quality Guidelines for the natural aquatic environment. *Water Science and Technology*. Vol. 32 (5-6): 293-299.
- Marañón, E.; Arribas, P.; Coya, B.; Sastre, H. (1996). Ensayos analíticos de ecotoxicidad. *Control de metales traza en agua y sedimentos. Tecnología del Agua*, 156: 41-55.
- Marañón, E.; Coya, B.; Sastre, H. (1997). Estudio de la ecotoxicidad de residuos industriales y su relación con el contenido en metales pesados. *Residuos*, 37: 48-52.
- Marcus, A.H. and A.P. Holtzman. 1988. A robust statistical method for estimating effects concentrations in short-term fathead minnow toxicity tests. Report prepared for EPA's Office of Water contract with Battelle Washington Environmental Program Office, Washington, D.C., June 1988, Contract No. 69-03-3534, 39 pp.
- Massart, D.L.; Vandeginste, B.G.M.; Demins, S.N.; Michotte, Y.; Kauffman, L. (1988). *Chemometrics: A Textbook*. Elsevier, Amsterdam.
- Miller, W.E.; Greene, J.C.; Shiroyama, T. (1978). The *Selenastrum capricornotum* Printz algal assay bottle test: experimental design, application, and data interpretation protocol EPA-600/9-78-018. Corvallis, OR.
- Millington, L.A.; Goulding, K.H.; Adams, N. (1988). The influence of growth medium composition on the toxicity of chemicals to algae. *Water Research*, 22: 1593-1597.
- Missimer, C.L.; Lemarie, D.P.; Rue, W.J. (1989). Evaluation of a chronic estimation toxicity test using *Skeletonema costatum*. *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 12th Volume*. ASTM, Philadelphia.
- Morales, M.M.; Martih, P.; Llopis, A.; Campos, L. Sagrado, S. (1999). An environmental study by factor análisis of surface seawater in the Gulf of Valencia (Western Mediterranean). *Anal. Chim. Acta*, 394: 109-117.

- Morel, J.L.; Bitton, G.; Koopman, B. (1988). Use of microtox for assessing copper complexation with organic compounds. *Archieve of Environmental Contamination and Toxicology*, 17: 493-496.
- Moreno Garrido, I. (1997). Toxicidad y acumulación de metales pesados en microalgas marinas usadas en acuicultura. Tesis Doctoral, Universidad de Cádiz.
- Moreno-Garrido, I.; Lubián, L.M.; Soares, A.M.V. (2000). Influence of cellular density on determination of EC50% in microalgal growth inhibition tests. *Ecotoxicological and Environmental Safety*, 47: 112-116.
- Nagpal, N.K. (1987). Water quality criteria for lead. Technical Appendix. Water Management Branch. Ministry of Environment and Parks. British Columbia.
- Naylor, C. G. (1995). Environmental fate and safety of nonylphenol ethoxylates. *American Association of Textile Chemists and Colourists. Text. Chem. Colorist*. 27:29-33.
- NETAC (National Environmental Technology Applications Corporation) (1991). Oil spill bioremediation products testing protocol methods manual. Universidad de Pittsburg, Applied Research enter, Pittsburg.
- Newman, P.J. (1992). Surface water quality indicators. En: Colombo AG (ed.) *Environmental Impact Assessment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Norberg-King, T.J. (1988). An Interpolation Estimate for Chronic Toxicity: The ICp Approach. NETAC Technical Report 05-88, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN.
- Norberg-King, T.J. (1993). An Interpolation Estimate for Chronic Toxicity: The ICp Approach, Version 2.0. NETAC Technical Report 05-88, U.S. Environmental Protection Agency, Duluth, MN.
- Nyberg, H. (1988). Growth of *Selenastrum capricornutum* in the presence of synthetic surfactants. *Water Research*. 22: 217-223
- Nyholm, N.; Källqvist, T. (1989). Methods for growth inhibition toxicity tests with freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 8:689-703.
- O'Kelley, J.C.; Deason, T.R. (1976). Degradation of pesticides by algae. Office of Research and Development. ERPA-60013-76-022. Athens, GA: USEPA.
- O'Kelley, J.C.; Deason, T.R. (1986). Degradation of pesticides by algae. Office of Research and Development, ERPA-60013-76-022. Athens, GA: US. Environmental Protection Agency.
- OECD (1984). Alga growth inhibition test. Test guideline N° 201. OECD Guidelines for Testing of Chemicals. Paris.
- OECD (1984). OECD guideline for testing of chemicals: alga, growth inhibition test.
- OECD (1997). SIDS initial assessment report for 6th SIAM. Prepared by M. Thomas, Environmental Agency, National Centre for Ecotoxicology and Hazardous Substances, Londres.
- OECD (1998). OECD Series on Testing and Assessment, Number 10: Report of the OECD Workshop on Statistical Analysis of Aquatic Toxicity Data. ENV/MC/CHEM. (98)18. OECD, Paris.
- Okamoto, O.K.; Asano, C.; Aidar, E.; Colepicolo, P. (1996). Effects of cadmium on growth and superoxide dismutase activity of the marine microalga *Tetraselmis gracillius* (Prasinophyceae). *Journal of Phycology*, 32: 74-79.
- OMOE (Ontario Ministry of the Environment) (1984). Water management: Goals, policies, objectives and implementation procedures of the Ministry of the Environment. Toronto, Ontario.
- OMOE (Ontario Ministry of the Environment) (1992). Ontario's water quality objective development process. Prepared by Aquatic Criteria Development Committee. Water Resources Branch.
- OPPTS (1996). Serie 850. Ecological Effects Test Guidelines. 850-5400: Algal toxicity, Tiers I and II. EPA/712/C-96/164.
- OSPAR (1998). Report of the Third OSPAR Workshop on Ecotoxicological Assessment Criteria. OSPAR Commission, London, UK.
- Ott, W.R. (1978). Environmental Indices. Theory and Practice. Ann Arbor Science, Michigan, USA.
- Otto, M (1998). Multivariate methods. In *Analytical Chemistry*, ed. R. Kellner, J.M. Mermet, M. Otto y H.M. Widmer. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Pack, S. (1993). A review of statistical data analysis and experimental design in OECD aquatic toxicology Test Guidelines. Shell research LTD. Sittingbourne, Kent, UK.
- Painter, H.; Zabel, T. (1986). Review of the environmental safety of LAS. Technical Report CO 1659-M/EV 8658. Water Research Center. Medmenham, Reino Unido.
- Palmer, C.M. Maloney (T.E.) Preliminary screening for potential algicides. *Ohio Journal of Science*, 1: 1-8.
- Parson, T.R.; Meita, Y.; Colli, C.M. (1989). *Manual of Chemical and Biological Methods for seawater analysis*.
- Patoczka, J. y Pulliam, G. W. (1990). Biodegradation and secondary effluent toxicity of ethoxylated surfactants. *Water Research*. 24: 965-972

- Payne, A.G.; Hall, R.H. (1979). A method for measuring algal toxicity and its application to the safety assessment of new chemicals. *Aquatic Toxicology*, edited by L.L. Marking, R.A. Kimberle. ASTM, Philadelphia.
- Peña Sánchez de Rivera, D. (1990). *Estadística. Modelos y métodos: Fundamentos*. Alianza editorial, 1990.
- Perales, J.A. (2000). Variabilidad de la biodegradación y toxicidad de compuestos xenobióticos en el medio marino. Aplicación a lineal alquil benceno sulfatos en aguas del Golfo de Cádiz. Tesis Doctoral. Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y Tecnologías del Medio Ambiente. Universidad de Cádiz.
- Peterson, H.G. (1991). Toxicity testing using a chemostat-grown green alga, *Selenastrum capricornotum*. *Plants for Toxicity Assessment: Second Volume*, edited by J.S. Gorsuch, W.R. Lower, W.Wang, M.A. Lewis. ASTM, Philadelphia.
- Prati, L.; Pavanello, R.; Pesarin, F. (1971). Assessment of surface water quality by a single index of pollution. *Water Research*, 5: 741-751.
- Provencher, M.; Lamontagne, J. (1979). A method for establishing a water quality index for different uses. *Gouvernement du Quebec. Ministère des richesses naturelles, le Service de la qualité des eaux, Bibliothèque Nationale du Québec*.
- Rachlin, J.W.; Warkentine, B.; Jensen, T.E. (1983). The growth response of the diatom *Chlorella saccharophyla*, *Navicula incerta* and *Nitzschia closterium* to selected concentrations of cadmium. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, Vol. 110 (2): 217-223.
- Ramamoorthy, R.; Baddaloo, E.G. (1995). *Handbook of chemical toxicity profiles of biological species. Volume I: Aquatic Species*. CRC Press, Inc.
- Rand, G.M (ed.) (1995). *Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*. Second Edition. Ed. Taylor & Francis, Washington.
- Read, P.A.; Anderson, K.J.; Mattheuws, J.E.; Watson, P.G.; Halliday, M.C.; Shields, G.M. (1982). Water Quality in the Fifth of Forth. *Marine Pollution Bulletin*, 13: 421-425.
- Reedy, K.R.; Smith, W.H. (eds.) (1987). *Aquatic plants for water treatment and resource recovery*. Magnolia Publishing.
- Research Institute for Public Health and Environment, Bilthoven (RIVM) (1997). *Environmental outlook for the Netherlands*. RIVM, the Netherlands.
- Ribo, J.M.; Kaiser, K.L.E. (1987). Photobacterium phosphoreum toxicity bioassay. I. Test procedure and applications. *Tox. Assess*, 2: 305-323.
- Riva, M.C.; López, D.; Fabián, L. (1998). Toxicidad de organofosforados en microalgas. *Boletín Intexter (UPC)*, 113: 25-29
- Rodier (1992). *Análisis de las aguas. Aguas naturales, aguas residuales y agua de mar*. Ed. Omega, Barcelona.
- Rodríguez, R.; Garrido, C.; D. Sales and Alonso, Q. (2001). Monitoring toxicity in four wastewater discharges in Bay of Cadiz. 11th Annual Meeting of Setac Europe: From Basic Science to Decision-Making: "The Environmental Odyssey". Madrid.
- Rosa de la, M.; Hervás, M.; Serrano, A., Losada; M. (1990). *Fotobioquímica. Ciencias de la Vida*. Ed. Síntesis. Madrid.
- Ross, S.L. (1977). An index system for classifying river water quality. *Water Pollution Control*, 113-121.
- Roux, D.J.; Jooste, S.H.J.; MacKay, H.M. (1996). Substance-specific water quality criteria for the protection of South African freshwater ecosystems: methods for derivation and initial results for some inorganic toxic substances. *South African Journal of Science*, Vol. 92, 198-206.
- Schiewe, M.H.; Hawk, E.G.; Actor, D.I.; Krahn, M.M. (1985). Use of a bioluminescence assay to assess toxicity of contaminated marine sediments, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 42: 1244-1248.
- Scottish Development Department (SDD) (1976). *Development of a Water Quality Index (Report AR3)* Scottish Development Department, Edinburgh, UK.
- Seager, J. (1994). Developments in water quality standards and classification schemes in England and Wales. *Water Science and Technology*, 30: 11-19.
- Shapiro, S.S.; Wilk, M.B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biométrica* 52:591-611.
- Shin, P.K.S.; Lam, W.K.C. (2000). Development of a Marine Sediment Pollution Index. *Environmental Pollution*, 113: 281-291.
- Singleton, H.J. (1985). Water quality criteria for particulate matter. Resource Quality Section. Water Management Branch. British Columbia Ministry of the Environment. Victoria, British Columbia.
- Skowronski, T.; Szubinska, S.; Pawlik, B.; Jakubowski, M. (1991). The influence of pH on cadmium toxicity to the green alga *Stichococcus bacillaris* and on the cadmium forms present in the culture medium. *Environmental Pollution*, 74: 89-100.
- Smith, D.G. (1990). A better water quality indexing system for rivers and streams. *Water Research*, 24 (10): 1237-1244.

- Smith, P.D.; Brockway, D.L.; Stancil, F.E. (1987). Effects of hardness, alkalinity and pH on the toxicity of pentachlorophenol to *Selenastrum capricornotum* (Printz). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 6: 891-900.
- Smith, V.H.; Tilman, G.D.; Nekola, J.C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environmental Pollution*, 100: 179-196.
- Snedecor, G.W.; W.G. Cochran. (1980). *Statistical Methods*. Seventh Edition. Iowa State University Press, Ames, Iowa.
- Somasundaram, L.; Coast, J.R.; Racke, K.D.; Stahr, H.M. (1990). Application of the microtox system to assess the toxicity of pesticides and their hydrolysis metabolites. *Arch. Envir. Contam. Toxicol.*, 44: 254-259.
- Soomi, L.; Suzuki, M.; Tamiya, E.; Karube, I. (1990). Microbial detection of toxic compounds utilizing recombinant DNA technology and bioluminescence. *Anal. Chim. Acta*, 244: 201-206.
- Stambuk-Giljanovic, N. (1999). Water Quality Evaluation by Index in Dalmatia. *Water Research*, 33 (16): 3423-3440.
- StatSoft (1997). STATISTICA[®] for the Windows Operating System. Release, 5.1. StatSoft, Tulsa, OK, USA.
- Steel, R.G.; Torrie, J.H. (1960). *Principles and procedures of statistics with special reference to biological sciences*. McGraw-Hill Publ., NY, NY.
- Stephan, C.E., D.I. Mount, D.J. Hansen, J.H. Gentile, G.A. Chapman and W.A. Brungs (1985). Guidelines for deriving numerical national water quality criteria for the protection of aquatic organisms and their uses. PB85-227049. Environmental Research Laboratories, Office of Research and Development. Environmental Protection Agency. Washington, District of Columbia. 98 pp.
- Stephens, M.A. (1974). EDF statistics for goodness of fit and some comparisons. *J. Amer. Stat. Assoc. JASA*) 69:730-373.
- Symons, B.D.; Sims, R.C. (1988). Assessing detoxification of a complex hazardous waste, using the microtox bioassay. *Arch. Envir. Contam. Toxicol.*, 17: 497-505.
- Tabachnic, B.G.; Fidell, L.S. (1996). *Using Multivariate Statistics*, 3rd Edition. HaperCollins College Publishers, New York, USA.
- Talmage, S. S. (1994) *Environmental and human safety of major surfactants. Alcohol ethoxylates and alkylphenol ethoxilates. The soap and Detergent Association. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida. EEUU.*
- Tchobanoglous, G. (1987). *Aquatic plant systems for wastewater treatment: engineering considerations*.
- Thomas, J.M.; Skalski, J.R.; Cline, J.F.; McShane, M.; Greene, J.C. (1986). Characterization of chemical waste site contamination and determination of its extent using bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5: 487-501.
- Thursby, G.B.; Anderson, F.B.; Walshe, G.E. Steele, R.L. (1993). A review of the current status of marine algal testing in the United States. First Symposium on Environmental Toxicology and Risk Assessment: Aquatic. Plant and Terrestrial. ASTM STP 1179. Philadelphia, American Society for Testing and Materials.
- Tovar, A. (2000). *Desarrollo de métodos normalizados para la determinación de micronutrientes. Evaluación del impacto ambiental en acuicultura marina intensiva. Tesis Doctoral. Departamento de Química Analítica. Universidad de Cádiz.*
- Train, R.E. (1972). The quest for environmental indices. *Science* 178, 121.
- Tripathi, B.D.; Shukla, S.C. (1991). Biological treatment of wastewater by selected aquatic plants. *Environmental Pollution*, 69: 69-78.
- TSCA (Code of Federal Regulations) (1990). *Environmental effects testing guidelines*. 40 CFR.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) (1998). *Guidance for Data Quality Assessment. Practical Methods for Data Analysis. EPA/600/R-96/084. USEPA, Quality Assurance Division.*
- US USEPA (United States Environmental Protection Agency) EPA (1985). *Toxic substances control act test guidelines; final rules. Federal Register* 50: 797.1050, 797.1075.
- USEPA (1994). *Guidance for data quality assessment. Practical methods for data analysis. EPA QA/G-9. QA97 Version. Office of Research and Development, USEPA, Washington.*
- USEPA (Environmental Protection Agency) (1989). *Assessing human health risks from chemically contaminated fish and shellfish: A guidance manual. EPA-503/8-89-002. Office of Water Regulations and Standards. Washington, District of Columbia. 91 pp + app.*
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1971). *Inter-laboratory precision test –an eight laboratory evaluation of the provisional algal Assay Procedure Bottle Test. Corvallis, OR: National Eutrophication Research Laboratory.*
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1974). *Marine algal assay procedure bottle test. Corvallis, OR: Eutrophication and Lake Restoration Branch National Environmental Research Center.*
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1980). *Water Quality Criteria Documents: Availability. Federal Register*, 45 (231): 79318-79379.

- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1983). Guidelines for deriving site-specific water quality criteria. In: *Water Quality Standards Handbook*. Office of Water Regulations and Standards. Washington, District of Columbia.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1985). Standard evaluation procedure: acute toxicity test for estuarine and marine organisms. Hazard Evaluation Division.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1985). Toxic substances control act test guidelines; final rules. Federal Register 50: 797.1050, 797.1075 y 797.1060.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1986). Quality Criteria for Water. EPA 440/5-86-001. Washington DC.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1986). Standard evaluation procedure: acute toxicity test for estuarine and marine organisms. Hazard Evaluation Division.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1988). Description and use of health risk assessments. Integrated Risk Information System Background Document 1. Washington, District of Columbia. 19 pp.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1989). Sediment classification methods compendium. Final Draft Report. Washington, District of Columbia.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1991). Pre-draft technical guidance on the application of sediment quality criteria for the protection of aquatic life. Office of Science and Technology. Washington, District of Columbia.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1992). Sediment classification methods compendium. EPA 823-R-92-006. Office of Water. Washington, District of Columbia.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency) (1999). 1999 Update of Ambient Water Quality Criteria for Ammonia. EPA-822-R-99-014. USEPA, Washington.
- Utsunomiya, A.; Watanuki, T.; Matsushita, K.; Nishina, M.; Tomita, I. (1997). Assessment of the toxicity of linear alkylbenzene sulphonate and quaternary alkylammonium chloride by measuring ¹³C-glycerol in *Dunaliella* sp. *Chemosphere*, Vol 35 (11): 2479-2490.
- Van Hassel, J.H. and A.E. Gaulke (1986). Site-specific water quality criteria from in-stream monitoring data. *Environ. Toxicol. Chem.* 5:417-426.
- Vanhaecke, P., Persoone, G.; Claus, C.; Sorgeloos, P. (1980). Research on the development of a short term standard toxicity test with *Artemia* nauplii. En: *The brine shrimp Artemia*. Vol. 1, Morphology, Genetics, Radiobiology, Toxicology. G.P. Persoone, P. Sorgeloos, O. Roels, E. Jaspers (eds.) Universal Press. Wetteren, Belgium.
- Vasseur, P.; Ferard, J.F.; Babut, M. (1991). The biological aspects of the regulatory control of industrial effluents in France. *Chemosphere*, 22:626-633.
- Vasseur, P.; Ferard, J.F.; Rasr, C.; Weingertner, P. (1986). Le test microto et le controle de la qualité des aux. *J. Franc. D'Hydro.*
- Vega, M.; Pardo, R.; Barrado, E.; Debán, L. (1998). Assessment of seasonal and polluting effects on the quality of river water by exploratory data analysis. *Water Research*, 32 (12): 3581-3592.
- Visviki, I.; Rachlin, J.W. (1991). The toxic action and interactions of copper and cadmium to the marine alga *Dunaliella minuta*, in both acute and chronic exposure. *Archieve of Environmental Toxicology*, 20: 271-175.
- Walsh, G.E. (1988). Principles of toxicity testing with marine unicellular algae. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 7: 979-987.
- Walsh, G.E.; Alexander, S.V. (1980). A marine algal bioassay method: results with pesticides and industrial wastes. *Water Air Soil Pollution*, 13: 45-55.
- Walsh, G.E.; Yoder, M.J.; McLaughlin, L.L.; Loes, E.M. (1987). Responses of marine unicellular algae to brominated organic compounds in six growth media. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 14: 215-222.
- Ward, T.J.; Boeru, R.L. (1990). Acute static toxicity of nonylphenol to the marine alga (*Skeletonema costatum*). Prepared for the Chemical Manufacturers Association by Resource Analysts, Hampton, New Hampshire (Study No. 8970-CMA).
- Warn, A.E. (1982). Calculating consent conditions to achieve river quality objectives. *Eff. Wat. Treat. J.* 22(4):152-156.
- Weber (1993). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA/600/4-90/027F.
- Weiss, C.M.; R.W. Helms. (1971). Interlaboratory precision test: An eight-laboratory evaluation of the Provisional Algal Assay Procedure Bottle Test. National Eutrophication Research Program. U. S. Environmental Protection Agency, Corvallis, OR 97333.
- Wenning, R.J.; Erickson, G.A. (1994). Interpretation and analysis of complex environmental data using chemometric methods. *Trends Anal. Chem.*, 13: 446-457.
- Willet, P. (1987). Similarity and clustering in chemical information systems. Research Studies Press, Wiley, New York.

- Williams, J. B.; Blessing, L. R. y Varineau, P. T. (1996) Aquatic fate and effects testing: data on alkylphenol ether carboxylates. Final Project Report. Infrastructure and Central Technology. Union Carbide Corporation, South Charleston, W. Va. EEUU.
- Willingham, T.W (1988). Using in situ bioassays as a basis for the development of site-specific water quality criteria. In: D.D. MacDonald (Ed.). Proceedings of the Canada - British Columbia Workshop on Water Quality Guidelines and Objectives: Focus on the Fraser. Water Quality Branch. Environment Canada. Vancouver, British Columbia.
- Wolverton, B.C.; Barlow, R.M.; McDonald, R.C. (1975). Application of vascular aquatic plants for pollution removal, energy and food production in a biological system. NASA Tech. Memo. No. TMX-72726. Bay St. Louis, MS: National Space Technology Laboratory.
- Wong, C.K.C.; Cheung, R.Y.H.; Wong, M.H. (1999). Toxicological assessment of coastal sediments in Hong Kong using a flagellate, *Dunaliella tertiolecta*. Environmental Pollution, 105: 175-183.
- Wunderlin, D.A.; Días, M.P.; Amé, M.V.; Pesce, S.F.; Hued, A.C.; Bistoni, M.A. (2001). Pattern recognition techniques for the evaluation of spatial and temporal variations in water quality. A case study: Suquia River Basin (Córdoba, Argentina). Water Research, 35 (12): 2881-2894.
- Yúfera, M; Lubián, L.M. (1990). Effects of microalgal diet on growth and development of invertebrates in marine aquaculture. In: Introduction to applied phycology, 209-227. I. Akatsuka ed. SPB Academic Publishing BV. The Hague, Netherlands.
- Zagatto, P.A.; Lorenzetti, M.L.; Lamparelli, M.C.; Salvador, M.E.P.; Menegon Jr., N; Bertoletti, E. (1999). Aperfeiçoamento de um índice de qualidade de águas. Acta Limnológica Brasiliensia, Vol.11 (2): 111-126.
- Zagatto, P.A.; Lorenzetti, M.L.; Perez, L.S.N.; Menegon, N.; Buratini, S.V. (1998). Proposal for a new water quality index. Verh. Internat. Verein. Limnol. 26: 2449-2451.
- Zandbergen, P.A.; Hall, K.J. (1998). Analysis of the British Columbia Water Quality Index for Watershed Managers: a case study of two small watersheds. Water Quality Resources Journal Canada, Vol. 33 (4): 519-549.
- Zou, J.; Zhang, J.; Wy, J.; Zhang, F.; Gu, T.; Wu, Y. (1988). On organic pollution and its control in the Haihe estuarine area of the Bohai Bay. Studies of marine Sinica, 29: 1-20.

LEGISLACIÓN CONSULTADA

- Boletín Oficial de la Junta de Andalucía (BOJA) (1994). Ley 7/1994, de 18 de mayo, de Protección Ambiental. BOJA nº 175, de 4 de noviembre de 1994.
- Boletín Oficial de la Junta de Andalucía (BOJA) (1996). Decreto 14/1996, de 16 de enero, por el que se aprueba el Reglamento de la calidad de las aguas litorales. (BOJA nº 19, de 8 de febrero de 1996, p. 1344)
- Boletín Oficial de la Junta de Andalucía (BOJA) (1997). Orden de 14 de febrero de 1997, por la que se clasifican las aguas litorales andaluzas y se establecen los objetivos de calidad de las aguas afectadas directamente por los vertidos, en desarrollo del Decreto 14/1996, de 16 de enero, por el que se aprueba el Reglamento de calidad de las aguas litorales. BOJA nº 27, de 4 de marzo.
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1976). Entrada en vigor del Convenio para la protección del mar Mediterráneo contra la contaminación y de los Protocolos anejos, hechos en Barcelona, el 16 de febrero de 1976. (BOE nº 44, de 21 de febrero de 1976, p. 4107)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1976). Real Decreto 345/1993, de 5 de marzo, por el que se establecen las normas de calidad de las aguas y de la producción de moluscos y oros invertebrados marinos vivos. (BOE nº 74, de 27 de marzo de 1993, p. 9301)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1976). Real Decreto-Ley 11/1995, de 28 de diciembre, por el que se establecen las normas aplicables al tratamiento de las aguas residuales urbanas. (BOE nº 312, de 30 de diciembre de 1995, p. 37517)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1984). Instrumento de ratificación de 21 de mayo de 1984 del Protocolo sobre la protección del Mar Mediterráneo contra la contaminación de origen terrestre, hecho en Atenas el 17 de mayo de 1980. (BOE nº 152, de 26 de junio de 1984, p. 18550)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1987). Orden de 1 de julio de 1987 por la que se aprueban los métodos oficiales de análisis físico-químicos para aguas potables de consumo público. (BOE nº 163, de 9 de julio de 1987, p. 20911)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1987). Orden de 12 de noviembre de 1987 sobre normas de emisión, objetivos de calidad y métodos de medición de referencia relativos a determinadas sustancias nocivas o peligrosas contenidas en los vertidos de aguas residuales. (BOE nº 280, de 23 de noviembre de 1987, p. 34790)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1988). Ley 221/1988, de 28 de julio, de Costas. (BOE nº 181, de 29 de julio de 1988, p. 23386)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1988). Orden de 11 de mayo de 1988 sobre característica básicas de calidad que deben ser mantenidas en corrientes de agua superficiales cuando sean destinadas a la producción de agua potable. (BOE nº 124, de 24 de mayo de 1988, p. 15823)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1988). Orden de 16 de diciembre de 1988 relativa a los métodos y frecuencias de análisis o de inspección de las aguas continentales que requieran protección o mejora para el desarrollo de la vida piscícola. (BOE nº 306, de 22 de diciembre de 1988, p. 5909)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1988). Orden de 8 de febrero de 1988 relativa a los métodos de medición y a la frecuencia de muestreos y análisis de aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable. (BOE nº 53, de 2 de marzo de 1988, p. 6588)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1988). Real Decreto 734/1988, de 1 de julio, por el que se establecen normas de calidad de las aguas de baño. (BOE nº 167, de 13 de julio de 1988, p. 21634)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1989). Orden de 13 de marzo de 1989 por la que se incluye en la de 12 de noviembre de 1987 la normativa aplicable a nuevas sustancias nocivas o peligrosas que pueden formar parte de determinados vertidos de aguas residuales. (BOE nº 67, de 20 de marzo de 1989, p. 7692)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1989). Orden de 31 de octubre de 1989 por la que se establecen normas de emisión, objetivos de calidad, métodos de medida de referencia y procedimiento de control relativos a determinadas sustancias peligrosas contenidas en los vertidos desde tierra al mar. (BOE nº271, de 11 de noviembre de 1989, p. 35285)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1989). Real Decreto 258/1989, de 10 de marzo, por el que se establece la normativa general sobre vertidos de sustancias peligrosas desde tierra al mar. (BOE nº64, de 16 de marzo de 1989, p. 7359)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1990). Orden de 15 de octubre de 1990 por la que se modifica la Orden de 11 de mayo de 1988 sobre características básicas de calidad que deben mantenerse en las corrientes superficiales destinadas a la producción de agua potable. (BOE nº 254, de 23 de octubre de 1990, p. 31012)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1990). Real Decreto 1138/1990, de 14 de septiembre, por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria para el abastecimiento y control de calidad de las aguas potables de consumo público. (BOE nº 220, de 20 de septiembre de 1990, p. 27488)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1991). Orden de 2 de agosto de 1991 por la que se establecen las normas microbiológicas, límites de contenido en metales pesados y métodos analíticos para su determinación en los

- productos de la pesca y acuicultura para el consumo humano. (BOE nº 195, de 15 de agosto de 1991, p. 27153)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1991). Orden de 27 de febrero de 1991 por la que se modifica el anejo V de la de 12 de noviembre de 1987, relativa a normas de emisión, objetivos de calidad y métodos de medición de referencia, para vertidos de determinadas sustancias peligrosas, en especial los correspondientes a hexaclorociclohexano. (BOE nº 53, de 2 de marzo de 1991, p. 7173)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1991). Orden de 9 de mayo de 1991 por la que se modifica el anejo V de la Orden de 31 de octubre de 1989, por la que se establecen normas de emisión, objetivos de calidad, métodos de medida de referencia y procedimientos de control relativos a determinadas sustancias peligrosas contenidas en los vertidos desde tierra al mar. (BOE nº 116, de 15 de mayo de 1991, p. 15546)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1992). Orden de 25 de mayo de 1992 por la que se modifica la de 12 de noviembre de 1987 sobre normas de emisión, objetivos de calidad y métodos de medición de referencia relativos a determinadas sustancias nocivas o peligrosas contenidas en los vertidos de aguas residuales. (BOE nº 129, de 29 de mayo de 1992, p. 18317)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1992). Orden de 28 de octubre de 1992 por la que se amplía el ámbito de aplicación de la Orden de 31 de octubre de 1989 a cuatro nuevas sustancias peligrosas que pueden formar parte de determinados vertidos al mar. (BOE nº 267, de 6 de noviembre de 1992, p. 37631)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1993). Orden de 13 de julio de 1993, por la que se aprueba la Instrucción para el proyecto de conducciones de vertidos desde tierra al mar. (BOE nº178, de 27 de julio de 1993, p. 22861)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1993). Orden de 15 de julio de 1993, por la que se declaran las zonas de producción y protección o mejora de moluscos bivalvos, moluscos gasterópodos, tunicados y equinodermos marinos de la Comunidad Autónoma de Andalucía. (BOJA nº 85, de 5 de agosto de 1993, p. 1525)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1993). Orden de 20 de diciembre de 1993 por la que se hacen publicas las relaciones de zonas de producción de moluscos y otros invertebrados marinos vivos en el litoral español. (BOE nº312, de 30 de diciembre de 1993, p. 37682)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1994). Orden de 30 de noviembre de 1994 por la que se modifica la Orden del Ministerio de Obras Públicas y Urbanismo de 11 de mayo de 1988, sobre características básicas de calidad que deben ser mantenidas en las corrientes de aguas continentales superficiales cuando sean destinadas a la producción de agua potable. (BOE nº 298, de 14 de diciembre de 1994, P. 37620)
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (1997). Orden de 14 de febrero de 1997, por la que se clasifican las aguas litorales andaluzas y se establecen los objetivos de calidad de las aguas afectadas directamente por los vertidos, en desarrollo del Decreto 14/1996, de 16 de enero, por el que se aprueba el Reglamento de calidad de las aguas litorales. (BOJA nº 27, de 4 de marzo de 1997, p. 2591)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1975). Directiva 75/440/CEE, de 16 de junio de 1975, relativa a la calidad requerida para las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable en los estados miembros. (DOCE nº L 194, de 25 de julio de 1975, p. 26)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1976). Directiva 76/160/CEE, de 8 de diciembre de 1975, relativa a la calidad de las aguas de baño. (DOCE nº L 31, de 5 de febrero de 1976, p.1)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1976). Directiva 76/464/CEE, de 4 de mayo de 1976, relativa a la contaminación causada por determinadas sustancias peligrosas vertidas en el medio acuático de la Comunidad. (DOCE nº L 129, de 10 de mayo de 1976, p. 23)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1977). Decisión del Consejo de 25 de julio de 1977 relativa a la celebración del Convenio para la protección del Mar Mediterráneo contra la contaminación así como del Protocolo sobre la prevención de la contaminación del mar Mediterráneo causada por vertidos desde buques y aeronaves. (DOCE nº L 240, de 19 de septiembre de 1977)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1977). Recomendación de la Comisión a los Estados miembros invitados a la reunión intergubernamental de Barcelona. (DOCE nº L 240, de 19 de septiembre de 1977)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1978). Directiva 78/659/CEE, de 18 de julio de 1978, relativa a la calidad de las aguas continentales que requieren protección o mejora para ser aptas para la vida de los peces. (DOCE nº L 222, de 14 de agosto de 1978, p. 1)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1979). Directiva 79/869/CEE, de 9 de octubre de 1979, relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. (DOCE nº L 271, de 29 de octubre de 1979, p. 44)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1979). Directiva 79/923/CEE, de 30 de marzo de 1979, relativa a la calidad exigida a las aguas para cría de moluscos. (DOCE nº L 281, de 10 de noviembre de 1979, p. 47)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1981). Decisión del Consejo de 19 de mayo de 1981 relativa a la celebración del Protocolo sobre cooperación para combatir en situaciones de emergencia la contaminación del mar Mediterráneo causada por hidrocarburos y otras sustancias perjudiciales. (DOCE nº L 162, de 19 de junio de 1981)

- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1981). Directiva 80/788/CEE, de 15 de julio de 1980, relativa a la calidad de las aguas superficiales destinadas a la producción de agua potable. (DOCE nº L 319, de 7 de noviembre de 1981, p. 11)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1982). Directiva 82/176/CEE, de 22 de marzo de 1982, relativa a los valores límite y a los objetivos de calidad para los vertidos de mercurio del sector de la electrólisis de los cloruros alcalinos. (DOCE nº L 81, de 27 de marzo de 1982, p. 29)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1983). Directiva 83/513/CEE, de 26 de Septiembre de 1983, relativa a los valores límite y a los objetivos de calidad para los vertidos de cadmio. (DOCE nº L 291, de 24 de octubre de 1983, p. 1)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1984). Decisión del Consejo de 28 de febrero de 1983 relativa a la celebración del Protocolo sobre la protección del mar Mediterráneo contra la contaminación de origen terrestre. (DOCE nº L 67, de 12 de marzo de 1984)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1984). Directiva 84/156/CEE, de 8 de marzo de 1984, relativa a los valores límite y a los objetivos de calidad para los vertidos de mercurio de los sectores distintos de la electrólisis de los cloruros alcalinos (DOCE nº L 74, de 17 de marzo de 1984, p. 49)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1986). Directiva 86/280/CEE, de 12 de junio de 1986, relativa a los valores límite y a los objetivos de calidad para los residuos de determinadas sustancias peligrosas comprendidas en la lista Y del Anexo de la Directiva 76/464/CEE. (DOCE nº L 181, de 4 de julio de 1986, p. 16)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1988). Directiva 88/347/CEE, de 16 de junio de 1988, por la que se modifica el Anexo II de la Directiva 86/280/CEE. (DOCE nº L 158, de 25 de junio de 1988, p. 35)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1990). Directiva 90/415/CEE, de 27 de julio de 1990, por la que se modifica el Anexo II de la Directiva 86/280/CEE. (DOCE nº L 219, de 14 de agosto de 1990, p. 49)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1991). Directiva 91/271/CEE, de 21 de mayo de 1991, sobre el tratamiento de las aguas residuales urbanas. (DOCE nº L 135, de 30 de mayo de 1991, p. 40)
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1991). Directiva 91/492/CEE, de 15 de julio de 1991, por la que se fijan las normas sanitarias aplicables a la producción y puesta en el mercado de moluscos bivalvos vivos.
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1991). Directiva 91/676/CEE del Consejo, de 12 de diciembre de 1991, relativa a la protección de las aguas contra la contaminación producida por nitratos utilizados en la agricultura. (DOCE nº L 375, 31 de diciembre de 1991).
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1993). Reglamento Nº 793/1993 del Consejo, de 23 de marzo de 1993, sobre evaluación y control del riesgo de las sustancias existentes. (DOCE nº L 84, 5 de abril de 1993).
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1996). Directiva 96/61/CE del Consejo, de 24 de septiembre de 1996, relativa a la prevención y al control integrados de la contaminación. (DOCE nº L 257, 10 de octubre de 1996).
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1996). Directiva 96/61/CE del Consejo de 24 de septiembre de 1996, relativa a la prevención y al control integrados de la contaminación. (DOCE nº L 257, 10 de octubre de 1996).
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1998). Decisión 98/249/CE del Consejo, sobre la protección del medio marino del Nordeste Atlántico, firmado en París el 22 de septiembre de 1992. (DOCE nº L 375, 31 de diciembre de 1998).
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (1998). Directiva 98/83/CE relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. (DOCE nº L 330, 5 de diciembre de 1998).
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (2000). Directiva 2000/60/ce del Parlamento Europeo y del Consejo por la que se establece un Marco Comunitario de Actuación en el Ámbito de la Política de Aguas. (DOCE nº L 327/1, 22 de diciembre de 2000).
- Diario Oficial de las Comunidades Europeas (DOCE) (2001). Decisión 2455/2001/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de noviembre de 2001 por el que se aprueba la lista de sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. (DOCE nº L 331/1, de 15 de diciembre de 2001).

ANEXOS

- Anexo I. Calibración físico-químicos
- Anexo II. Resultados obtenidos para el LAS
- Anexo III. Resultados obtenidos para el NP9EO
- Anexo IV. Resultados obtenidos para el FENOL
- Anexo V. Resultados obtenidos para el LINDANO
- Anexo VI. Resultados obtenidos para el COBRE
- Anexo VII. Resultados obtenidos para el CADMIO
- Anexo VIII. Resultados obtenidos para el ZINC
- Anexo IX. Resultados obtenidos para LAS y AGUAS RECEPTORAS
- Anexo X. Resultados AGUAS RECEPTORAS
- Anexo XI. Coeficientes estadísticos
- Anexo XII. Protocolos de limpieza
- Anexo XIII. Reactivos utilizados. Abreviaturas

ANEXO I. PARÁMETROS DE ESTUDIO. METODOS DE ANÁLISIS

1. PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS

1.1 COLIFORMES FECALES

Son bacterias Gram negativas, aerobias y anaerobias facultativas, capaces de fermentar la lactosa con producción de ácido, gas.

- ✘ Método de identificación y recuento: Filtración por membrana.
- ✘ Medio de cultivo: m-Fc.
- ✘ T^a de incubación: 44,5°C. (±0,5°C)
- ✘ Tiempo de incubación: 24 horas
- ✘ Resultados: Colonias azules.
- ✘ Expresión de resultados: UFC./100 mL (Unidades Formadoras de Colonias por 100 mL de muestra).

Preparación de las placas.

A 100 mL de agua destilada se añaden 3.7 g de caldo m-Fc (Difco), 1 mL de de ácido rosólico (preparado al 1% en NaOH 0,2 N. Una vez preparado es estable una semana) y 1,2 g de agar-agar (Panreac). Hervir manteniendo durante un minuto la ebullición. Dejar enfriar. Cuando la temperatura sea aproximadamente 40°C distribuir en placas de petri.

Cantidades de muestra a filtrar.

Para análisis en agua de mar, filtrar un volumen adecuado de manera que el número de colonias esté comprendido entre 20 y 60. El volumen máximo de muestra que se puede filtrar es de 25 mL, para evitar que se colmate la membrana filtrante de sal.

1.2. ESTREPTOCOCOS FECALES:

Son bacterias Grampositivas, aerobias y anaerobias facultativas.

- ✘ Método de identificación y recuento: Filtración por membrana.
- ✘ Medio de cultivo: Agar KF.
- ✘ T^a de incubación: 37°C. (±1°C).
- ✘ Tiempo de incubación: 48 horas
- ✘ Resultados: Colonias rojas. (Se cuentan todos independientemente de su forma y tamaño)
- ✘ Expresión de resultados: U.F.C./100 mL (Unidades Formadoras de Colonias por 100 mL de muestra).

Preparación de las placas.

A 100 mL de agua destilada se añaden 7.1 g de Agar KF (Millipore). Hervir manteniendo durante un minuto la ebullición. Dejar enfriar. Cuando la temperatura sea aproximadamente 50°C se añade 1 mL de TTC (preparado al 1% en agua destilada). Posteriormente distribuir en placas petri.

Cantidades de muestra a filtrar.

Agua de mar: Igual que para coliformes fecales.

2. PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

2.1. PARÁMETROS IN SITU. PH, TEMPERATURA, OXÍGENO DISUELT O, SALINIDAD

2.1.1. DESCRIPCIÓN DE LOS PARÁMETROS

El *pH* y la *temperatura* son dos de los factores ambientales más importantes para todos los organismos acuáticos. La temperatura influye en la oxigenación de las aguas, en la productividad primaria y a los procesos metabólicos del agua. El pH además, es uno de los parámetros más frecuentes en los análisis de agua. Es una medida de la acidez-alcalinidad del agua y es un factor fundamental en los sistemas químicos y biológicos de los medios acuáticos marinos. El agua marina está fuertemente tamponada, lo que hace que su pH varíe poco. De forma general puede decirse que oscila entre 8 y 8,3. En zonas donde exista una intensa actividad vegetal puede llegar a tener valores cercanos a 9; en zonas donde exista un fuerte consumo de oxígeno y producción de CO₂, los valores pueden oscilar entre 7,6 y 7,9. La *salinidad* es un parámetro oceanográfico, y para muchos propósitos, los términos "contenido total de sal disuelta" y "salinidad" son equivalentes. En el medio marino, los valores normales oscilan entre 30 y 40 aunque estos márgenes pueden ser más amplios en determinadas zonas estuáricas.

2.1.2 MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.1.2.1. pH: ELECTROMETRÍA

El principio básico de la determinación electrométrica del pH es la medida de la actividad de los iones hidrógeno por mediciones potenciométricas. Los medidores de pH que generalmente se utilizan para muestras ambientales consisten en un potenciómetro, un electrodo de vidrio, un electrodo de referencia y un dispositivo para compensar la temperatura. La fuerza electromotriz (fem) producida en el sistema de electrodo de vidrio varía linealmente con el pH y esta relación lineal se describe comparando la "fem" medida con el pH de diferentes tampones. El pH de la muestra se determina por extrapolación. Los "pHmetros" suelen ser exactos y reproducibles hasta 0,1 unidades de pH con una escala de 0 a 14, si bien, algunos pHmetros dan medidas de 0,01 unidades.

2.1.2.2. TEMPERATURA: TERMOMETRÍA

Normalmente las medidas de temperatura pueden realizarse con cualquier termómetro Celsius de mercurio, que como mínimo, deberá tener una escala con marcas cada 0,1°C sobre el tubo capilar y una capacidad térmica mínima que permita un equilibrado rápido.

Actualmente, existen en el mercado diferentes termómetros digitales de campo que aportan una medida exacta y reproducible de la temperatura del agua. Con el uso de este tipo de termómetros se evita la manipulación de termómetros de mercurio en una embarcación, y por lo tanto, posibles accidentes con este tipo de instrumental.

El termómetro utilizado en los muestreos ha sido un termómetro digital con una precisión de 0,01 °C

2.1.2.3. SALINIDAD: REFRACTOMETRÍA, CONDUCTIMETRÍA

La medida de la salinidad se realiza mediante un salinómetro consistente en un conductímetro de inducción con compensación térmica. Debido a que es conveniente realizar la medida in situ, se suele utilizar un refractómetro de campo el cual se basa en las propiedades de refracción del agua de mar. Mediante una escala, se determina la salinidad de la muestra con una precisión de 0,5.

2.2. PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS. CLOROFILA A

2.2.1. DESCRIPCIÓN DEL PARÁMETRO

El método químico más útil para determinar la cantidad total de fitoplancton en agua de mar es la estimación del contenido en clorofila (generalmente clorofila a).

La clorofila a se encuentra en todos los organismos autótrofos a excepción de las bacterias que desarrollan este proceso, en las que hay formas especiales de bacterioclorofila. La clorofila a se utiliza como indicador de la biomasa de algas. A pesar de que la relación (Clorofila a):(Biomasa Fitoplanctónica) es variable en un rango muy amplio y depende de procesos adaptativos y del estado fisiológico de las microalgas, se puede realizar un cálculo estimativo de su biomasa considerando que constituye un 1,5 por 100 del peso seco de la materia orgánica (peso sin cenizas) de las algas. Asumiendo esta relación, la biomasa de algas de obtendría multiplicando el contenido de clorofila a por un factor de 67.

2.2.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Para el análisis de clorofila se ha seguido el procedimiento colorimétrico que aparece recogido en "A manual of chemical and biological methods for seawater analysis" (Parsons *et. al*, 1989). Los pasos básicos de este método son los siguientes:

- ✗ Filtración de la muestra a través de un filtro de fibra de vidrio de 1 µm de diámetro de poro.
- ✗ Extracción con disolvente (acetona 90% v/v) de los pigmentos retenidos en el filtro.
- ✗ Centrifugación del extracto y extracción del sobrenadante. Determinación de la absorbancia del sobrenadante frente a un blanco de disolvente a las siguientes longitudes de onda: 750, 664, 647 y 630 nm.
- ✗ Determinación del contenido de clorofila mediante las siguientes ecuaciones:

Ca: Clorofila a = 11,85 E664 - 1,54 E647 - 0,08 E630

Cb: Clorofila b = 21,03 E647 - 5,43 E664 - 2,66 E630

Cc: Clorofila c = 24,52 E630 - 1,67 E664 - 7,60 E647

siendo *E* la absorbancia obtenida a la longitud de onda especificada menos la absorbancia a 750 nm.

Utilizando una cubeta de 1 cm⁻¹ de paso de luz, el contenido en clorofila en mg/m³ se calcula así:

$$\text{Clorofila, mg}\cdot\text{m}^{-3} = \frac{C \times v}{V \times 10}$$

donde *v* es el volumen de acetona utilizado en la extracción (mL), *V* es el volumen de agua de mar filtrada y *Ca*, *Cb*, y *Cc* se han sustituido en la fórmula por *C*.

2.3. ESPECIACIÓN DE NITRÓGENO. AMONIO, NITRITOS Y NITRATO

2.3.1. DESCRIPCIÓN DE LOS PARÁMETROS

La presencia natural de nitratos y nitritos en el medio ambiente es una consecuencia del ciclo del nitrógeno. Ambas especies químicas son esenciales para la gran mayoría de los autótrofos fotosintéticos, en especial los componentes del fitoplancton. Los dos compuestos aparecen en pequeñas concentraciones en el medio acuático. En el medio marino, la formación de amonio se debe a fermentos proteolíticos principalmente bacterianos o de animales. Parte de este amonio es absorbido posteriormente por las algas para formar parte de sus aminoácidos.

De manera general se considera al nitrógeno inorgánico y en particular al nitrato, limitante del crecimiento autótrofo de los ecosistemas marinos.

2.3.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.3.2.1. AMONIO: MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DEL AZUL DE INDOFENOL (Grasshoff, 1983; Rodier, 1990).

Este método es el más adecuado para el análisis de bajas concentraciones de amonio en agua de mar.

El mecanismo de reacción de este procedimiento es el siguiente. En un medio alcalino y en presencia de nitroprusiato, que actúa como catalizador, los iones amonio tratados por una solución de hipoclorito sódico y de fenol dan el azul de indofenol susceptible de una determinación colorimétrica.

Los pasos básicos de este procedimiento son los siguientes:

- ✂ A 50 mL de muestra filtrada (filtro de fibra de vidrio de 0,45 μm) se le añade 2 mL de reactivo de fenol (10g de fenol en 100 mL de alcohol de 95°), 1 mL de solución de citrato (100 g de citrato sódico, 5 g de hidróxido sódico y 500 mL agua destilada exenta de amonio), y 5 mL de reactivo de hipoclorito (100 mL de solución de citrato mas 25 mL de hipoclorito sódico aprox. 1,5N).
- ✂ Dejar en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente (20-27°C).
- ✂ Efectuar lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 640 nm.
- ✂ La cantidad de amonio presente en la muestra se determina por comparación de la absorbancia obtenida mediante el procedimiento anterior con una recta de calibración obtenida a partir de patrones de CINH_4 sometidos al mismo procedimiento que la muestra y fabricados sobre una matriz salina de 35.

2.3.2.2. NITRITOS. MÉTODO ESPECTROFOTOMÉTRICO DE LA SULFANILAMIDA (Grasshoff, 1983; Rodier, 1990).

Este método es el más adecuado para bajos contenidos de nitritos en agua de mar.

El mecanismo de reacción de este procedimiento es el siguiente. La diazotación de la sulfanilamida en medio ácido y su copulación con la N-(1-naftil)-etilen-diamina da un complejo coloreado púrpura susceptible de determinación colorimétrica.

El procedimiento es el siguiente:

- ✂ A 50 mL de muestra filtrada (filtro de fibra de vidrio de 0,45 μm) se le añade 1 mL de reactivo de sulfanilamida (1 g en 100 mL de ácido clorhídrico al 10%).
- ✂ Se mezcla bien y se deja reposar durante 5 min, tras lo cual se añade 1 mL de solución de N(1-naftil)-etilen-diamina al 0,1%

- ✘ Dejar en reposo durante 10 min a temperatura ambiente (20-27°C).
- ✘ Efectuar lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro a la longitud de onda de 543 nm.
- ✘ La cantidad de nitrógeno nitroso presente en la muestra se determina por comparación de la absorbancia obtenida mediante el procedimiento anterior con una recta de calibración obtenida a partir de patrones de nitrito sódico, sometidos al mismo procedimiento que la muestra y fabricados sobre una matriz salina de 35 ‰

2.3.2.3. NITRATOS. REDUCCIÓN A NITRITOS MEDIANTE COLUMNA DE CADMIO Y POSTERIOR DETERMINACIÓN DE NITRITOS (Grasshoff, 1983).

Este método es el único indicado para la determinación de nitratos en agua de mar. Debido a la naturaleza salina de la matriz del agua de mar, el único método colorimétrico posible es mediante una previa reducción de nitratos a nitritos haciendo pasar la muestra a través de una columna de cadmio.

Una vez realizado este procedimiento, se determina el contenido en nitritos mediante el procedimiento de la sulfanilamida.

Hay que tener la precaución de restar el contenido "real" de nitritos a la hora de expresar los resultados en términos de nitratos.

2.4. ESPECIACIÓN DE FÓSFORO. FOSFATOS Y FÓSFORO TOTAL

2.4.1. DESCRIPCIÓN DEL PARÁMETRO

Los fosfatos es uno de los principales factores limitantes en los requerimientos nutritivos de los seres autótrofos fotosintéticos y por lo tanto, esencial para el desarrollo de la vida acuática. El fenómeno de eutrofización se asocia con altas concentraciones de este compuesto que al igual que sucede con el nitrógeno, modifican las condiciones de la masa de agua con una pérdida importante de su calidad tanto sanitaria como ecológica. Es difícil fijar los límites por encima de los cuales la eutrofización tiene lugar, pues entran en juego factores morfológicos, hidrológicos, ópticos y climáticos. Las fuentes de elementos eutrofizantes pueden ser difusas (aportes de tierra al mar) o puntuales (vertidos domésticos e industriales). El efecto de estos vertidos es cada vez más acusado cuando tienen lugar en zonas de hidrodinámica restringida como bahías cerradas o estuarios, creándose en muchas ocasiones, condiciones anaerobias en el bentos.

El fósforo presente en el agua de mar, en estado soluble o particular, existe en varias formas: fósforo inorgánico, compuesto esencialmente de ortofosfatos y polifosfatos (tri y piro) y fósforo orgánico procedente de las nucleoproteínas, fosfoproteínas, combinaciones azúcares-fosfatos y sus productos de oxidación. Analíticamente, el ion que se determina es el ortofosfato; el fósforo orgánico se transforma en ortofosfato por oxidación química o fotooxidación con radiaciones ultravioletas.

2.4.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

2.4.2.1. FOSFATOS. MÉTODO DEL ÁCIDO ASCÓRBICO (Grasshoff, 1983; APHA, 1989).

Este método es el más adecuado para bajos contenidos de fósforo en agua de mar (0,01 -6 mg/L P).

El molibdato amónico y el tartrato antimonílico potásico reaccionan en medio ácido con ortofosfato para formar un ácido heptapoliácido fosfomolibdico que se reduce a azul de molibdeno, de color intenso por el ácido ascórbico.

El procedimiento es el que se detalla:

- ✘ A 50 mL de muestra filtrada (filtro de fibra de vidrio de 0,45 μm) se le añade 0.05 mL (1 gota) de indicador de fenolftaleína. Si aparece un color rojo, añadir ácido sulfúrico 5N gota a gota hasta que empieza a desaparecer.
- ✘ Añadir 8 mL de reactivo combinado y agitar bien. El reactivo combinado está formado por 50 mL de sulfúrico 5N, 5 mL de tartrato antimonílico potásico(2,275 g/L), 15 mL de molibdato amónico (40 g/L) y 30 mL de ácido ascórbico (17,6 g/L). Mezclar tras la adición de cada reactivo. Esta mezcla es estable durante 4 horas.
- ✘ Al cabo de 10 minutos y antes de 30, medir la absorbancia a 880 nm con blanco de reactivos como referencia.
- ✘ Corrección de turbidez o color interferente. Preparar un blanco por adición a la muestra de todos los reactivos excepto el ácido ascórbico y el tartrato. Restar la absorbancia del blanco de la de cada muestra.
- ✘ La cantidad de fósforo correspondiente a ortofosfatos se determina por comparación de la absorbancia obtenida con una recta de calibración obtenida a partir de patrones de KH_2PO_4 anhidro, sometidos al mismo procedimiento. Para este método de análisis, no es necesario fabricar los patrones sobre una matriz salina (Tovar, 1998).

2.4.2.2. FÓSFORO TOTAL. DIGESTIÓN DE LA MUESTRA Y POSTERIOR DETERMINACIÓN DE FOSFATOS (Grasshoff, 1983; APHA, 1989).

Para determinar analíticamente el contenido total de fósforo de las muestras se ha realizado una oxidación química para la posterior determinación de ortofosfatos mediante un método colorimétrico.

Debido al bajo contenido de P de las muestras se ha realizado de la siguiente forma:

- ✎ Digestión ácida. Pipetear 25 mL de muestra sin filtrar en un matraz erlenmeyer. Añadir una mezcla de ácidos consistente en 5 mL de HNO₃ concentrado y 1 mL de H₂SO₄ concentrado. Las muestras se colocan en una placa calefactora y se realiza una digestión hasta la desaparición de humos amarillentos (ácido nitroso) o hasta casi sequedad. El residuo se traspasa a un matraz volumétrico de 50 mL. Para ello realizar varios lavados del erlenmeyer con agua bidestilada y recoger todas las aguas de lavado en el matraz volumétrico.
- ✎ Ajustar el pH con NaOH utilizando indicador de fenolftaleína.
- ✎ Determinación de ortofosfatos mediante el método del ácido ascórbico. Los patrones para la recta de calibración deben seguir el mismo procedimiento que la muestra.

2.5. MATERIAS EN SUSPENSIÓN

2.5.1. DESCRIPCIÓN DEL PARÁMETRO

El término "sólidos en suspensión" es un aspecto descriptivo de la materia particulada, orgánica e inorgánica, presente en el agua. Un alto contenido sólidos en suspensión provoca una reducción de la penetración de la luz en la masa de agua pudiendo afectar a los productores primarios y al resto de la cadena trófica.

La presencia de material en suspensión en agua de mar puede deberse a diferentes fuentes. Estas pueden ser de origen antropogénicos (p.e. presencia de vertidos de diferente naturaleza, sólidos flotantes, etc.), o bien, de origen natural (p.e. partículas de sedimento, microorganismos, etc).

En la definición de este parámetro desde el punto de vista del análisis químico, se consideran sólidos en suspensión al material que queda retenido sobre un filtro de tamaño de poro determinado y que no sea lo suficientemente grande como para considerarlos como sólidos flotantes (p.e. trozo de papel, plástico, etc). Aunque existen diversos criterios sobre los tamaños mínimo y máximo que deben considerarse para este parámetro, se suele utilizar de forma generalizada un diámetro de poro en los filtros de 0,45 µm. El tamaño máximo de partícula ya es más difícil de determinar, y generalmente se utiliza el criterio de la visibilidad de la partícula.

El término "sólidos en suspensión volátiles" es otro término de análisis químico. Se refiere a los sólidos en suspensión que se calcan a 550°C. Suele servir como indicativo del material orgánico en suspensión.

2.5.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Para determinar analíticamente los sólidos en suspensión se sigue el procedimiento que se resume a continuación:

- ✎ Se filtra un volumen de agua conocido de cada muestra utilizando un filtro de fibra de vidrio previamente pesado en una balanza analítica que al menos sea capaz de medir 0,0001 g. Se seca el filtro a 105°C durante 24 horas (o hasta peso cte.) y se pesa de nuevo el filtro una vez que ha recuperado la temperatura ambiente. La diferencia de pesada referido al volumen de muestra filtrada nos proporciona el contenido de materias en suspensión de la muestra.
- ✎ Para determinar los sólidos volátiles, se somete a calcinación el filtro utilizado en el análisis de sólidos en suspensión y se pesa una vez que haya adquirido la temperatura ambiente. La diferencia de pesada obtenidos antes y después de la calcinación referida al volumen de muestra filtrada, nos proporciona el contenido de materias volátiles e n suspensión de la muestra.

2.6. CARBONO DISUELTO

2.6.1. DESCRIPCIÓN DEL PARÁMETRO

La estimación de la contaminación orgánica es un problema complejo y delicado que depende de la naturaleza de los compuestos y el medio de dilución.

Debido a la naturaleza muy diversa de las materias orgánicas y a los diversos estados de degradación, no es posible considerar un único método o un solo ensayo que pueda permitir determinar el conjunto de la muestra. El balance se hará por comparación y yuxtaposición de los resultados asociados a las verificaciones de medida de los componentes de las materias orgánicas (N, P, C, etc.).

Las medidas tradicionales de contaminación orgánica para aguas residuales no son aplicables para agua de mar en el caso de la DQO (demanda química de oxígeno) debido a la fuerte interferencia de cloruros en el método analítico; y no son demasiado significativas para la DBO (demanda biológica de oxígeno) debido a que en el medio marino, las poblaciones bacterianas están presentes en ordenes de magnitud inferiores que en el medio continental.

Debido a estas dificultades analíticas en el medio marino, cada vez se está haciendo más frecuente el uso de la variable COT el cual nos mide la cantidad de carbono orgánico total disuelto en el agua como parámetro indicativo de contaminación.

2.6.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Para determinar analíticamente el carbono de la muestra se ha utilizado un método de combustión y detección por infrarrojos no dispersivos mediante un analizador TOC modelo 5050 de la casa SHIMADZU.

Mediante este equipo se realizan dos medidas: Carbono total, y Carbono Inorgánico. Mediante sustracción de ambas se obtiene el contenido en Carbono Orgánico.

Puesto que las muestras que se inyectan en el analizador TOC deben estar filtradas, la medida que se obtiene está referida a contenido de carbono disuelto.

2.7. TENSIOACTIVOS ANIÓNICOS

2.7.1. DESCRIPCIÓN DEL PARÁMETRO

Las sustancias que exhiben las características de modificar las interacciones interfaciales mediante la promoción de los fenómenos de adsorción, son conocidos como agentes de superficie o tensioactivos, y se encuentran entre los productos más utilizados en la tecnología química moderna. Se utilizan aceites de motor, lubricantes, detergentes, productos de cuidado personal, aditivos alimentarios, formulaciones farmacéuticas, etc. Los tensioactivos se clasifican según su comportamiento en medio acuoso en: aniónicos, catiónicos y no iónicos o anfóteros, siendo los primeros los más consumidos en el mundo y por lo tanto los más controlados desde un punto de vista legislativo.

2.7.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Método colorimétrico (MBAS). Método basado en la determinación de las sustancias activas al azul de metileno (Rodier, 1990)

En solución acuosa, la molécula polar de los tensioactivos aniónicos, forma con el azul de metileno (catiónico), un complejo soluble en cloroformo, susceptible de una determinación colorimétrica.

El procedimiento resumido es el siguiente:

- ✎ Se colocan 250 mL de muestra en un matraz erlenmeyer y se añaden 10 mL de solución tampón (10 g/L de fosfato disódico anhidro, a pH=10,5), 5 mL de solución de azul de metileno neutro (0,2 g/L) y 15 mL de cloroformo.
- ✎ Se agita uniformemente durante 2 minutos con un agitador electromagnético evitando la emulsión.
- ✎ Se vierte el contenido en un embudo de decantación y se recoge el extracto clorofórmico en un erlenmeyer que contenga 100 mL de agua destilada, 5 mL de solución neutra de azul de metileno y 1 mL de ácido sulfúrico 1N.
- ✎ Agitar durante 1 minuto con un agitador electromagnético durante 1 minuto, trasvasar a un segundo embudo de decantación y recoger el extracto clorofórmico final sobre un matraz volumétrico. Enrasar con cloroformo.
- ✎ Medir la absorbancia del extracto a 650 nm y determinar el contenido de tensioactivos comparando la absorbancia obtenida con una recta de calibración obtenida a partir de patrones fabricados con un compuesto patrón (generalmente LAS)

2.8. FENOLES

2.8.1. DESCRIPCIÓN DEL PARÁMETRO

Los fenoles incluyen una gran variedad de compuestos químicos orgánicos. Están formados por un anillo aromático unido a uno, dos o varios grupos hidroxilo. Su procedencia es diversa: de diferentes procesos industriales, de los residuos orgánicos, de la degradación microbiana de los pesticidas y de forma natural. Algunos fenoles no pueden ser degradados biológicamente y son transportados a través de la cadena trófica. Los fenoles son tóxicos para las especies acuáticas. Además, reducen la concentración de oxígeno disuelto al ser productos muy oxidables. Varias condiciones ambientales pueden aumentar la toxicidad del fenol como son las bajas concentraciones de oxígeno disuelto, el incremento de la salinidad y el incremento de la temperatura. La importancia para la salud de los compuestos fenólicos presentes en las aguas está relacionada con los compuestos sustitutivos del cloro (clorofenoles). Todos los clorofenoles son corrosivos o irritantes de la piel, ojos y membranas mucosas. Los fenoles que no contienen cloro no son cancerígenos y su toxicidad aguda es muy baja. Los clorofenoles y los fenoles huelen y saben de forma desagradable cuando está presente en la carne de los peces. El umbral del olor está en un rango desde los 55 mg/L para el p-cresol, hasta los 2 mg/L para el 2-clorofenol.

2.8.2. MÉTODOS DE ANÁLISIS

Método colorimétrico de la 4-amino-antipirina (APHA-AWWA-WPCF, 1992)

Este es el método más adecuado para la determinación de estos compuestos en muestras ambientales. Previamente al análisis colorimétrico hay que realizar una destilación de la muestra para eliminar un gran número de interferencias que presenta el análisis. Una vez destilada la muestra, se sigue el siguiente procedimiento:

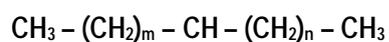
- ✘ A 500 mL de destilado añadir 12.0 mL de la disolución de NH_4OH 0.5N y ajustar a $\text{pH } 7.9 \pm 0.1$ con tampón fosfato.
- ✘ Se pasa la muestra a un embudo de separación de 1000 mL y se añade 3.0 mL de la solución de 4-aa (20 g/L) y 3.0 mL de la solución de ferricianuro potásico (80 g/L) y se mezcla bien.
- ✘ Esperar un mínimo 15 minutos a que aparezca el color.
- ✘ Se añaden 25 mL de cloroformo y se agita el embudo durante 2 minutos.
- ✘ El extracto se mide en el espectrofotómetro a 460 nm.
- ✘ El índice de fenoles de la muestra se determina comparando la absorbancia del extracto de la muestra con una recta de calibración fabricada a partir de patrones de fenol a los cuales se les ha sometido el mismo procedimiento que para la muestra.

ANEXO II. LINEAL ALQUIL BENCENO SULFONATO SÓDICO (LAS)

1. DATOS DE REFERENCIA

1.1. PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS

- Tensioactivo aniónico
- Suministro: Fluka Chemie A. G.
- Nombre del producto: Sal sódica del ácido dodecilbencenosulfonato
- Número del producto: 44200
- Fórmula empírica: $C_{18}H_{29}NaSO_3$
- Fórmula estructural:



$$m+n=7-10$$

- Peso molecular: 348,48 g/mol
- Apariencia: cristales finos de color amarillo-beige pálido
- Solubilidad en agua (20°C): 50g/L
- Pureza: 80,2 %
- Contenido en carbono: 48,17 %
- Composición:
 - 80,2% mezcla de homólogos e isómeros (C10-C13)
 - ~ 17% Sulfato de sodio
 - < 3% Agua

1.2. DATOS DE TOXICIDAD DE REFERENCIA

La siguiente tabla muestra algunos resultados de toxicidad obtenidos de la bibliografía:

Tabla A II.1a.
Datos de toxicidad del LAS en algunos grupos de organismos. Algas

| Especies | Medio | Tiempo Exposición (h) | Expresión de toxicidad | LAS (mg/L) | Referencia |
|----------------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|------------|------------------------------|
| <i>Chaetoceros gracilis</i> | Agua salada | 72 | EC50 | 2,150 | Perales (2001) |
| <i>Dunaliella salina</i> | Agua salada | 24 | EC50 | 3,500 | Utsonomiya et al. (1997) |
| <i>Dunaliella salina</i> | Agua salada | 72 | EC50 | 5,150 | Perales (2001) |
| <i>Dunaliella tertiolecta</i> | Agua salada | --- | Alguistática | 2,000 | Painter y Zabel (1988) |
| <i>Isochrysis galbana</i> | Agua salada | 72 | EC50 | 6,750 | Perales (2001) |
| <i>Nannochloropsis gaditana</i> | Agua salada | 72 | EC50 | 5,260 | Perales (2001) |
| <i>Tetraselmis chuii</i> | Agua salada | 72 | EC50 | 4,270 | Perales (2001) |
| <i>Dunaliella primolecta</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 8,620 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Microcystis aeruginosa</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,900 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Microcystis aeruginosa</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 5,000 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Lemna minor</i> | Agua dulce | 48 | LOEC | 2,19 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Navícula Peliculosa</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 1,400 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Selenastrum capricornotum</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 29,000 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Selenastrum capricornotum</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 120,000 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |

Tabla A II.1b.
Datos de toxicidad del LAS en algunos grupos de organismos. Crustáceos

| Especies | Medio | Tiempo Exposición (h) | Expresión de toxicidad | LAS (mg/L) | Referencia |
|-------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|------------|------------------------------|
| <i>Artemia</i> | Agua salada | 24 | EC50 | 11,62 | Perales (2001) |
| <i>Mysidopsis bahia</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 1,420 | Painter y Zabel (1988) |
| <i>Penaeus duorarum</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 66 | Painter y Zabel (1988) |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,11 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,12 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,15 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,2 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,59 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,68 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,8 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 21 d | EC50 | 1,11 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 21 d | EC50 | 1,17 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 21 d | EC50 | 1,5 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 21 d | EC50 | 1,67 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 2,19 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 2,63 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 2,7 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 3 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 3,94 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 5,6 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 5,88 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 6,84 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 21,15 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia Magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 29,55 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |

Tabla A II.1c.
Datos de toxicidad del LAS en algunos grupos de organismos. Otros invertebrados

| Especies | Medio | Tiempo Exposición (h) | Expresión de toxicidad | LAS (mg/L) | Referencia |
|----------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|------------|-------------------------------|
| <i>Crasostrea sp.</i> | Agua salada | 48 | EC50 | 7,4 | Painter y Zabel (1988) |
| <i>Crasostrea sp.</i> | Agua salada | 6 | EC50 | 1 | Perales (2001) ⁽¹⁾ |
| <i>Tapes philippinarum</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 10,5 | Perales (2001) ⁽¹⁾ |
| <i>Chironomus sp.</i> | Agua dulce | 72 | NOEC | 1 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Chironomus sp.</i> | Agua dulce | 72 | EC50 | 2,2 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Chironomus sp.</i> | Agua dulce | 72 | LOEC | 4.7 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |

Tabla A II.1d.
Datos de toxicidad del LAS en algunos grupos de organismos. Peces

| Especies | Medio | Tiempo Exposición (h) | Expresión de toxicidad | LAS (mg/L) | Referencia |
|-------------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|------------|------------------------------|
| <i>Gadus morrhua</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 1 | Swedmark et al. (1971) |
| <i>Pleuronectes flesus</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 1,5 | Swedmark et al. (1971) |
| <i>Pleuronectes platessa</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 1 | Swedmark et al. (1971) |
| <i>Pomatochistus microps</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 2,6 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Sparus aurata (huevos)</i> | Agua salada | 24 | EC50 | 0,1 | Hampel (2001) |
| <i>Sparus aurata (huevos)</i> | Agua salada | 24 | EC50 | 0,2 | Hampel (2001) |
| <i>Sparus aurata (huevos)</i> | Agua salada | 24 | EC50 | 0,5 | Hampel (2001) |
| <i>Sparus aurata (huevos)</i> | Agua salada | 24 | EC50 | 0,6 | Hampel (2001) |
| <i>Sparus aurata (huevos)</i> | Agua salada | 24 | EC50 | 4,4 | Hampel (2001) |
| <i>Sparus aurata (huevos)</i> | Agua salada | 24 | EC50 | 7,7 | Hampel (2001) |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 6,17 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 72 | EC50 | 7 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 7,48 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 7,6 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Lepomis macrochirus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 1,7 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 30 d | NOEC | 0,1 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 60 d | NOEC | 0,106 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 30 d | LOEC | 0,25 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 60 d | LOEC | 0,252 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 30 d | NOEC | 0,28 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 30 d | LOEC | 0,37 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 30 d | NOEC | 0,48 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 30 d | LOEC | 0,49 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 4,1 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 40 d | NOEC | 5,1 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 40 d | NOEC | 8,4 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 40 d | LOEC | 8,4 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 40 d | LOEC | 9,8 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 12,3 | ECETOC (1993) ⁽¹⁾ |

¹ Referencias recogidas en los documentos indicados pero no pertenecientes a estos autores

2. ENSAYOS DE MICROALGAS MARINAS

RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Volumen de los viales de ensayo: 15 mL
- Volumen de solución de ensayo: 4 mL
- Agua de dilución: agua de mar sintética
- Medio nutriente adicional: si, medio f/2
- Temperatura de ensayo: $20 \pm 0,1$ °C
- Iluminación: constante, 11000 lux
- Aireación: diaria -de forma manual-
- Duración del ensayo: 10 días (+ 10 para el estudio de la concentración alguistática y alguicida)
- Medidas de biomasa: turbidez, a $\lambda = 690$ nm

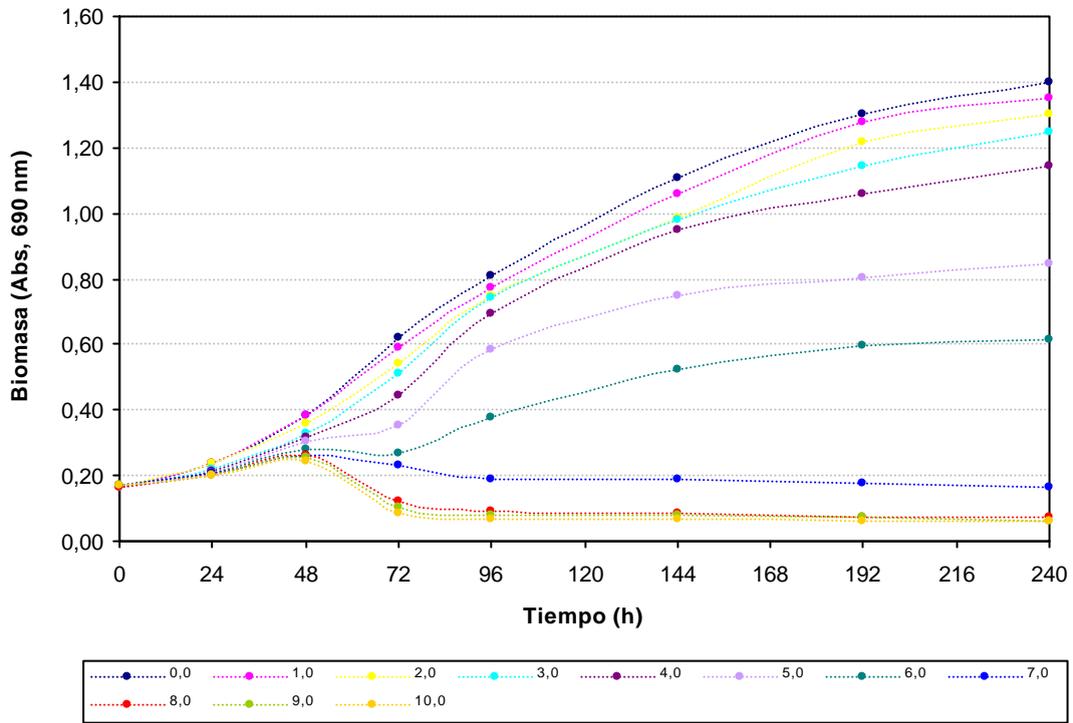
MICROALGAS ENSAYADAS

- *Nannochloropsis gaditana*
- *Isochrysis galbana*
- *Dunaliella salina*
- *Chaetoceros gracilis*
- *Tetraselmis chuii*

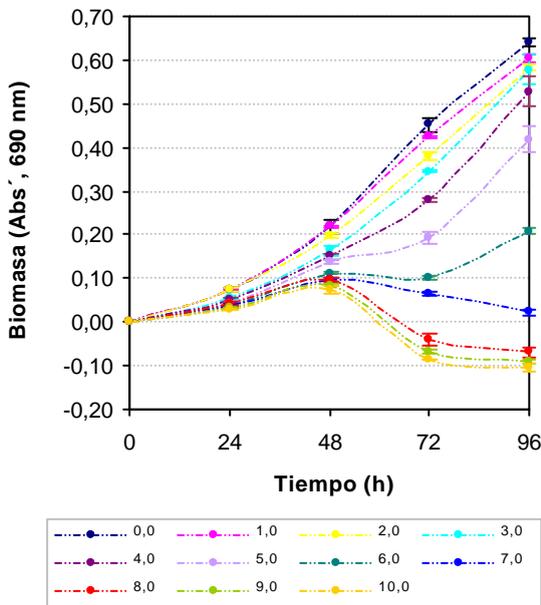
RESULTADOS OBTENIDOS

- Valores de biomasa (Abs, 690 nm) de cada tratamiento
- Valores experimentales de NOEC y LOEC
- Valores experimentales de inhibición calculados a partir del ICp programa (Las observaciones inferiores de las tablas (*) y (**) están referidas a indicaciones realizadas por el programa)
- Concentraciones alguistáticas y alguicidas experimentales

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

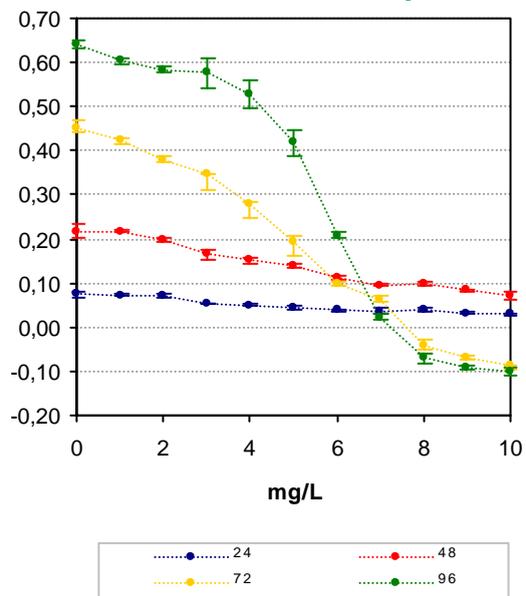


Tabla A II.4.

Valores de NOEC y LOEC experimentales obtenidos para *N. gaditana* expuesta a diferentes concentraciones de LAS.

| <i>N. gaditana</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|--|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,981 | | 0,960 | | 0,941 | | 0,957 | |
| B calculado | 13,18 | | 15,89 | | 13,13 | | 10,82 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L LAS | t _i | p |
| 1,0 | 0,46 | 0,36056 | -0,05 | 0,48694 | 4,01 (*) | 0,02012 | 3,38 (*) | 0,00253 |
| 2,0 | 0,58 | 0,35012 | 3,42 (*) | 0,05237 | 10,16 | 0,00117 | 5,25 | 0,00047 |
| 3,0 | 7,14 (*) | 0,00205 | 8,57 | 0,00514 | 14,97 | 0,00017 | 6,49 | 0,00304 |
| 4,0 | 8,17 | 0,00210 | 11,01 | 0,00132 | 24,39 | 0,00003 | 10,89 | 0,00063 |
| 5,0 | 10,48 | 0,00073 | 12,96 | 0,00064 | 36,51 | 0,00001 | 19,76 | 0,00004 |
| 6,0 | 12,32 | 0,00022 | 17,13 | 0,00021 | 49,28 | 0,00000 | 39,19 | 0,00000 |
| 7,0 | 12,89 | 0,00057 | 19,90 | 0,00012 | 54,32 | 0,00000 | 55,99 | 0,00000 |
| 8,0 | 11,40 | 0,00073 | 19,84 | 0,00012 | 68,91 | 0,00000 | 64,35 | 0,00000 |
| 9,0 | 14,39 | 0,00011 | 21,74 | 0,00008 | 72,88 | 0,00000 | 66,28 | 0,00000 |
| 10,0 | 15,66 | 0,00008 | 23,64 | 0,00009 | 75,49 | 0,00000 | 67,34 | 0,00000 |
| MSD | 0,008 | | 0,016 | | 0,019 | | 0,029 | |
| % reducción | 10,28 | | 7,43 | | 4,17 | | 4,55 | |
| <p><i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola).</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,932 | | 0,938 | | 0,948 | | 0,947 | | 0,943 | | 0,941 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 6,96 | | 7,90 | | 8,55 | | 9,26 | | 10,53 | | 18,13 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L LAS | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 1,0 | 3,56(*) | 0,02 | 3,77(*) | 0,02 | 3,93(*) | 0,02 | 3,67(*) | 0,02 | 3,82(*) | 0,02 | 4,01(*) | 0,02 |
| 2,0 | 9,04 | 0,00 | 9,55 | 0,00 | 9,97 | 0,00 | 9,30 | 0,00 | 9,69 | 0,00 | 10,16 | 0,00 |
| 3,0 | 13,31 | 0,00 | 14,07 | 0,00 | 14,68 | 0,00 | 13,70 | 0,00 | 14,27 | 0,00 | 14,97 | 0,00 |
| 4,0 | 21,68 | 0,00 | 22,92 | 0,00 | 23,92 | 0,00 | 22,31 | 0,00 | 23,25 | 0,00 | 24,39 | 0,00 |
| 5,0 | 32,46 | 0,00 | 34,32 | 0,00 | 35,80 | 0,00 | 33,41 | 0,00 | 34,82 | 0,00 | 36,51 | 0,00 |
| 6,0 | --- | --- | 46,33 | 0,00 | 48,33 | 0,00 | 45,10 | 0,00 | 47,00 | 0,00 | 49,28 | 0,00 |
| 7,0 | --- | --- | --- | --- | 53,27 | 0,00 | 49,71 | 0,00 | 51,80 | 0,00 | 54,32 | 0,00 |
| 8,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 63,06 | 0,00 | 65,72 | 0,00 | 68,91 | 0,00 |
| 9,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 69,50 | 0,00 | 72,88 | 0,00 |
| 10,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 75,49 | 0,00 |
| MSD | 0,020 | | 0,019 | | 0,019 | | 0,020 | | 0,019 | | 0,019 | |
| % reducción | 4,44 | | 4,25 | | 4,12 | | 4,45 | | 4,30 | | 4,17 | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | | | | | |

Tabla A II.5.
Valores de ICp del ensayo de *N. gaditana* y LAS a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de LAS estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,7901 | 0,2115 | 0,5146 | 0,8238 | 1,1658 | 1,5790 | 0,1794 |
| | 25 | 3,0928 | 2,5009 | 2,8110 | 3,0843 | 3,2575 | 3,4386 | 0,1034 |
| | 50 | 4,6019 | 4,3659 | 4,4895 | 4,6041 | 4,7445 | 4,9013 | 0,0664 |
| | 75 | 5,8622 | 5,7369 | 5,8025 | 5,8622 | 5,9252 | 5,9944 | 0,0316 |
| | 95 | 7,6497 | 7,5791 | 7,6161 | 7,6489 | 7,6764 | 7,7058 | 0,0153 |
| 96 | 5 | 0,8589 | 0,4712 | 0,6743 | 0,8832 | 1,2250 | 1,6277 | 0,1384 |
| | 25 | 2,7694 | 1,9652 | 2,3865 | 3,1686 | 4,5719 | 6,5546 | 0,8084 |
| | 50 | 5,4634 | 0,2719 | 2,9913 | 5,3604 | 5,5183 | 5,5788 | 0,4063 |
| | 75 | 6,2585 | 6,1890 | 6,2254 | 6,2580 | 6,2853 | 6,3147 | 0,0151 |
| | 95 | 6,9494 | 6,8841 | 6,9183 | 6,9488 | 6,9933 | 7,0417 | 0,0186 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

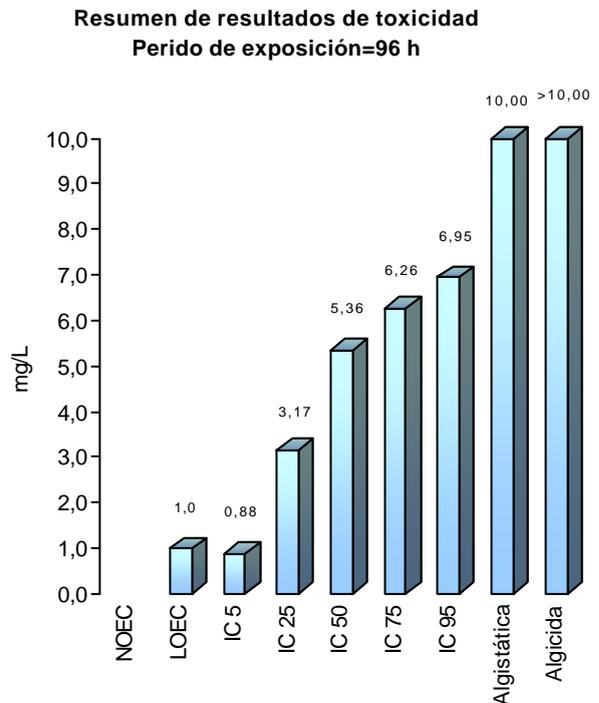
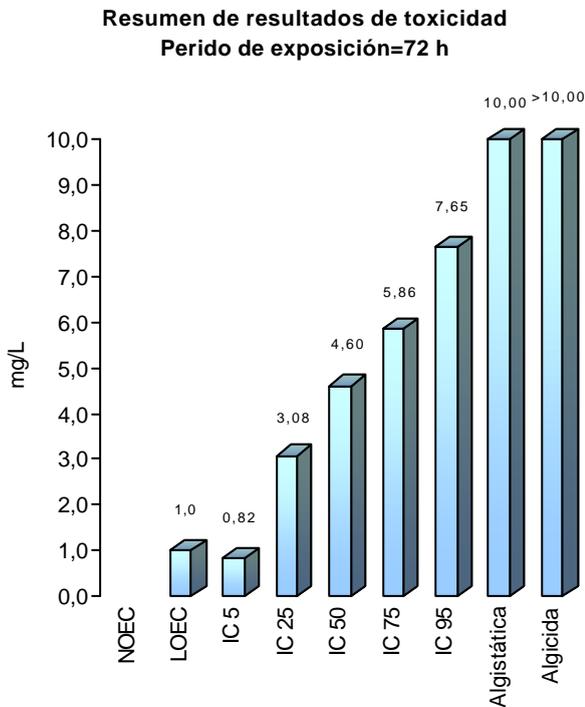
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las tres concentraciones más altas de LAS ensayadas con *N. gaditana* (8, 9 y 10 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa de los tres viales.

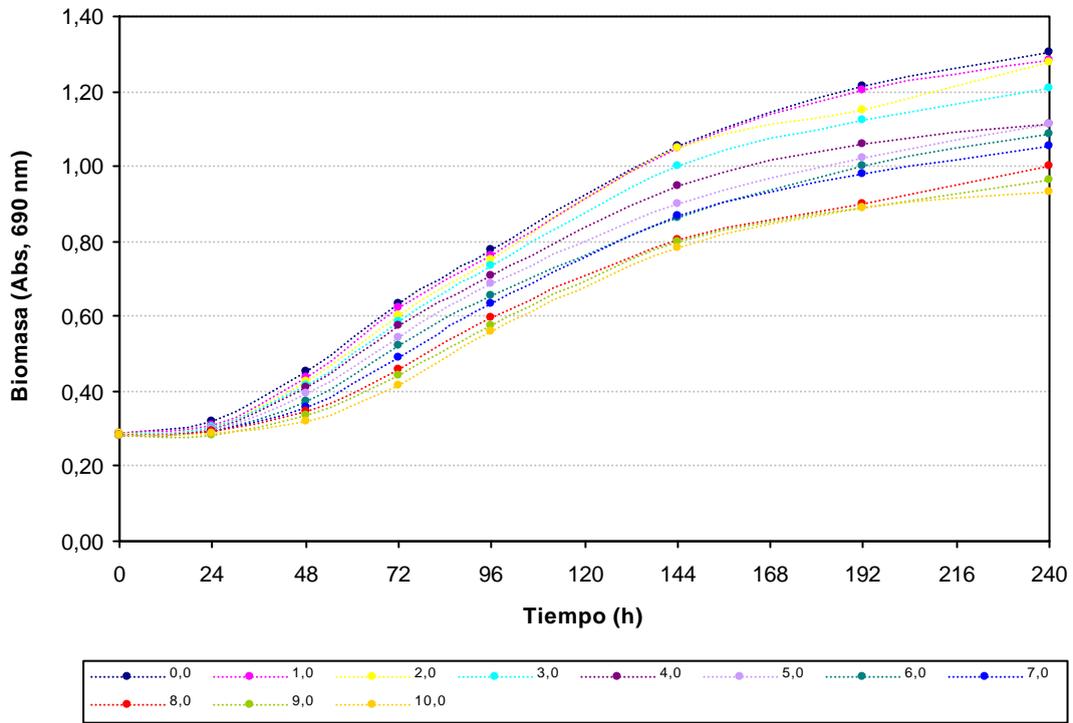
- Concentración alguistática= 10 mg/L
- Concentración alguicida= No se ha determinado experimentalmente

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

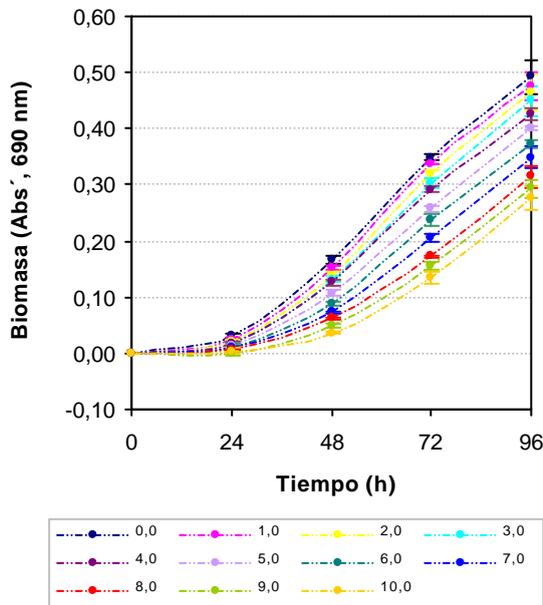
De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del LAS y *N. gaditana*.



Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

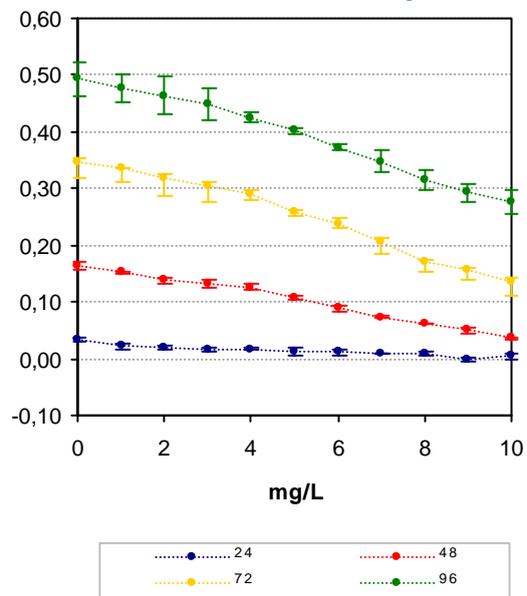


Tabla A II.8.

Valores de NOEC y LOEC experimentales obtenidos para *I. galbana* expuesta a diferentes concentraciones de LAS.

| <i>I. galbana</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|--|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,946 | | 0,975 | | 0,971 | | 0,970 | |
| B calculado | 8,38 | | 11,43 | | 10,49 | | 9,65 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L LAS | t _i | p |
| 1,0 | 3,01 (*) | 0,03121 | 3,75 (*) | 0,01828 | 2,28 | 0,01008 | 1,00 | 0,24347 |
| 2,0 | 3,95 | 0,00461 | 7,42 | 0,00384 | 5,60 (*) | 0,00243 | 1,67 | 0,16006 |
| 3,0 | 4,78 | 0,00189 | 9,16 | 0,00160 | 8,43 | 0,00092 | 2,53 | 0,06946 |
| 4,0 | 4,78 | 0,00189 | 10,71 | 0,00096 | 10,65 | 0,00011 | 3,90 (*) | 0,01054 |
| 5,0 | 6,03 | 0,00427 | 16,02 | 0,00015 | 16,75 | 0,00001 | 5,28 | 0,00332 |
| 6,0 | 6,44 | 0,00166 | 21,15 | 0,00004 | 20,56 | 0,00003 | 6,93 | 0,00127 |
| 7,0 | 7,07 | 0,00019 | 25,27 | 0,00001 | 26,41 | 0,00001 | 8,37 | 0,00111 |
| 8,0 | 7,48 | 0,00033 | 28,39 | 0,00001 | 32,57 | 0,00000 | 10,31 | 0,00047 |
| 9,0 | 10,60 | 0,00012 | 31,77 | 0,00001 | 35,65 | 0,00000 | 11,56 | 0,00027 |
| 10,0 | 8,63 | 0,00092 | 35,62 | 0,00000 | 39,59 | 0,00000 | 12,44 | 0,00028 |
| MSD | 0,008 | | 0,010 | | 0,014 | | 0,046 | |
| % reducción | 26,18 | | 5,81 | | 4,10 | | 9,29 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|--|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | | |
| W calculado | 0,976 | | 0,957 | | 0,954 | | 0,962 | | 0,957 | | 0,971 | | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | | |
| B calculado | 7,44 | | 8,07 | | 8,10 | | 9,91 | | 9,91 | | 10,49 | | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | | |
| mg/L LAS | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | | |
| 1,0 | 2,49 | 0,01 | 2,29 | 0,01 | 2,27 | 0,01 | 2,39 | 0,01 | 2,40 | 0,01 | 2,28 | 0,01 | |
| 2,0 | 6,14(*) | 0,00 | 5,63(*) | 0,00 | 5,58(*) | 0,00 | 5,87(*) | 0,00 | 5,89(*) | 0,00 | 5,60(*) | 0,00 | |
| 3,0 | 9,24 | 0,00 | 8,47 | 0,00 | 8,40 | 0,00 | 8,83 | 0,00 | 8,87 | 0,00 | 8,43 | 0,00 | |
| 4,0 | 11,66 | 0,00 | 10,69 | 0,00 | 10,61 | 0,00 | 11,15 | 0,00 | 11,20 | 0,00 | 10,65 | 0,00 | |
| 5,0 | 18,34 | 0,00 | 16,81 | 0,00 | 16,68 | 0,00 | 17,53 | 0,00 | 17,62 | 0,00 | 16,75 | 0,00 | |
| 6,0 | --- | --- | 20,65 | 0,00 | 20,48 | 0,00 | 21,53 | 0,00 | 21,63 | 0,00 | 20,56 | 0,00 | |
| 7,0 | --- | --- | --- | --- | 26,30 | 0,00 | 27,65 | 0,00 | 27,78 | 0,00 | 26,41 | 0,00 | |
| 8,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 34,10 | 0,00 | 34,26 | 0,00 | 32,57 | 0,00 | |
| 9,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 37,50 | 0,00 | 35,65 | 0,00 | |
| 10,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 39,59 | 0,00 | |
| MSD | 0,012 | | 0,014 | | 0,014 | | 0,013 | | 0,013 | | 0,041 | | |
| % reducción | 3,55 | | 3,91 | | 3,99 | | 3,83 | | 3,84 | | 4,10 | | |
| * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | | | | | | |

Tabla A II.9.
Valores de ICp del ensayo de *I. galbana* y LAS a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de LAS estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 1,2833 | 0,6215 | 0,9682 | 1,3010 | 1,6346 | 2,0210 | 0,1558 |
| | 25 | 4,8939 | 4,5455 | 4,7280 | 4,9016 | 5,0951 | 5,3163 | 0,0908 |
| | 50 | 7,9400 | 7,7198 | 7,8352 | 7,9443 | 8,0818 | 8,2378 | 0,0615 |
| | 75 | (*) | | | | | | |
| | 95 | (*) | | | | | | |
| 96 | 5 | 1,6286 | -0,7871 | 0,4783 | 1,6530 | 3,2547 | 5,0435 | 0,8383 |
| | 25 | 6,1200 | 4,3245 | 5,2650 | 6,1226 | 7,0532 | 8,0796 | 0,4216 |
| | 50 | (*) | | | | | | |
| | 75 | (*) | | | | | | |
| | 95 | (*) | | | | | | |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; DesvEst.: Desviación estándar

(*) No es posible realizar la interpolación lineal del conjunto de datos para este porcentaje de respuesta

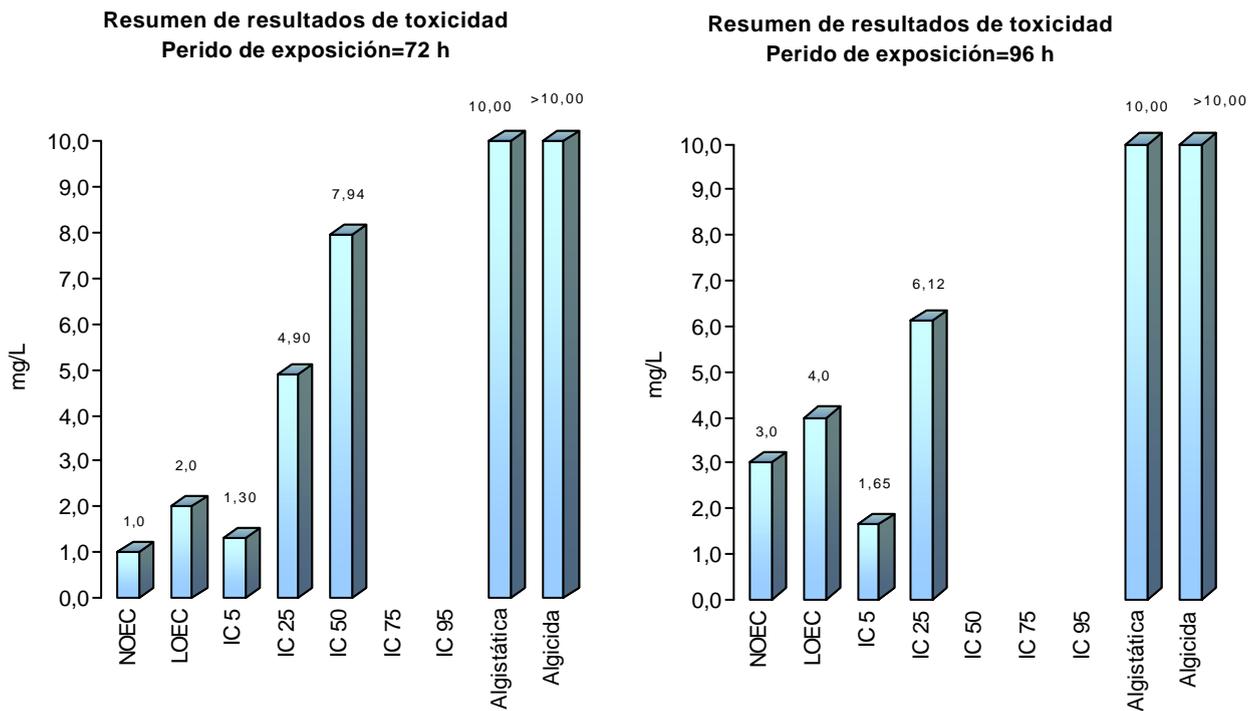
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las tres concentraciones más altas de LAS ensayadas con *I. galbana* (8, 9 y 10 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa de los tres viales.

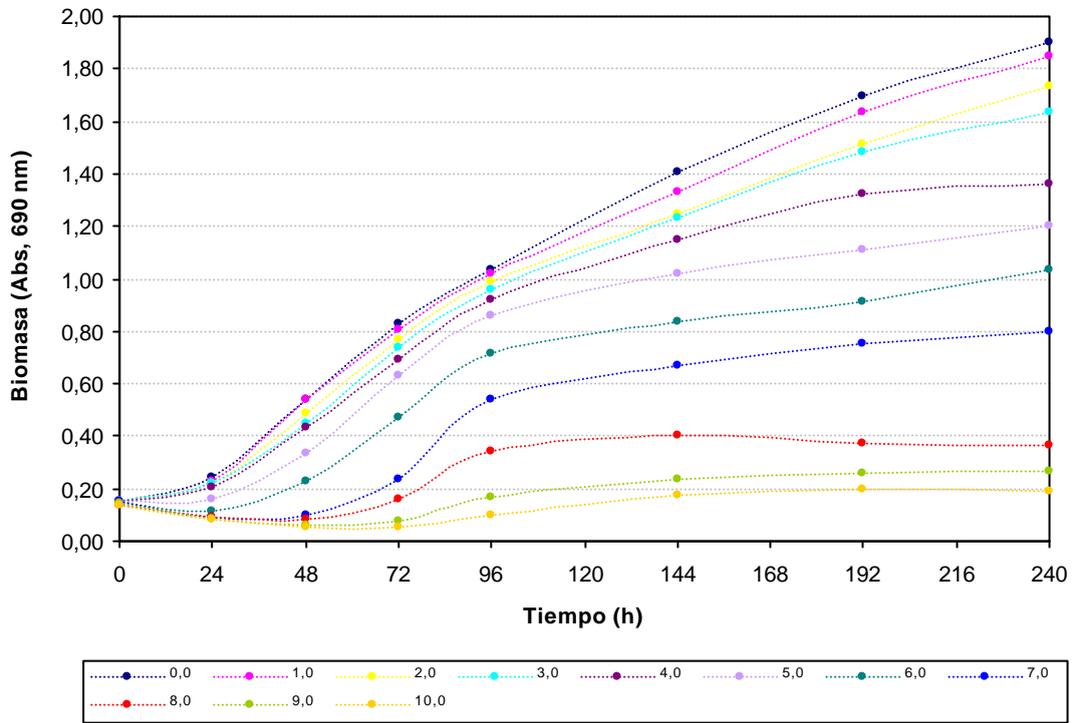
- Concentración alguistática= 10 mg/L
- Concentración alguicida= No se ha determinado experimentalmente

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

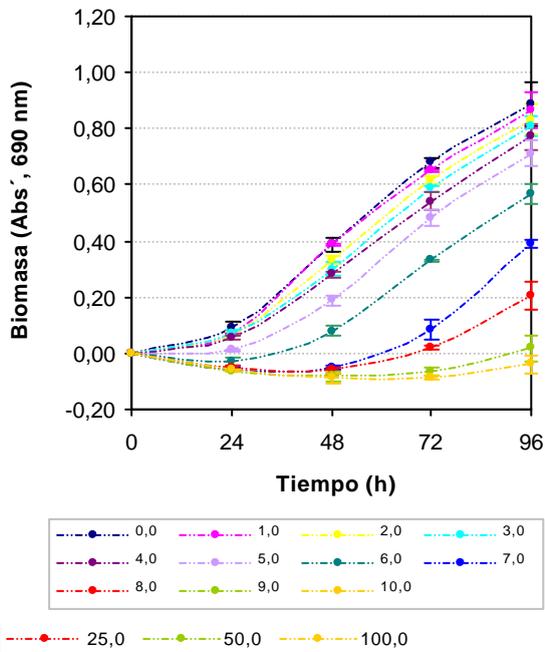
De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del LAS y *I. galbana*.



Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

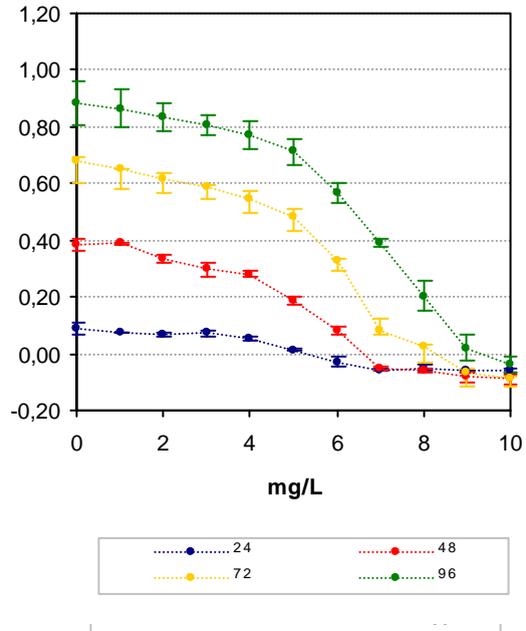


Tabla. A II.12.

Valores de NOEC y LOEC experimentales obtenidos para *D. salina* expuesta a diferentes concentraciones de LAS.

| <i>D. salina</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,974 | | 0,945 | | 0,947 | | 0,909 ⊗ ¹ | |
| B calculado | 14,56 | | 6,84 | | 16,89 | | 5,16 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L LAS | t _i | p | t _i | p | t _i | p | t _i | p |
| 1,0 | 2,04 | 0,12312 | -0,11 | 0,46041 | 1,84 | 0,02704 | 0,53 | 0,37041 |
| 2,0 | 2,49 | 0,09893 | 4,19 | 0,01108 | 3,74 (*) | 0,00627 | 1,32 | 0,19456 |
| 3,0 | 2,20 | 0,13218 | 6,98 (*) | 0,00459 | 5,86 | 0,00065 | 2,00 | 0,09385 |
| 4,0 | 4,21 (*) | 0,02904 | 8,35 | 0,00089 | 8,61 | 0,00123 | 2,89 (*) | 0,04780 |
| 5,0 | 9,34 | 0,00177 | 15,65 | 0,00011 | 12,37 | 0,00038 | 4,35 | 0,01549 |
| 6,0 | 14,23 | 0,00074 | 24,14 | 0,00002 | 22,03 | 0,00000 | 8,03 | 0,00157 |
| 7,0 | 17,80 | 0,00015 | 34,55 | 0,00000 | 37,68 | 0,00001 | 12,58 | 0,00021 |
| 8,0 | 17,04 | 0,00025 | 35,26 | 0,00000 | 41,57 | 0,00000 | 17,21 | 0,00011 |
| 9,0 | 18,40 | 0,00014 | 37,10 | 0,00000 | 47,30 | 0,00000 | 21,88 | 0,00004 |
| 10,0 | 18,04 | 0,00015 | 37,66 | 0,00000 | 48,55 | 0,00000 | 23,36 | 0,00002 |
| MSD | 0,022 | | 0,033 | | 0,042 | | 0,105 | |
| % reducción | 24,30 | | 8,64 | | 6,14 | | 11,81 | |
| <p>W crítica (N=33 y α=0,05)= 0,931; B crítica (V=No conc.-1, y α=0,05)=18,31; T crítica (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64</p> <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un α= 0,05 en la prueba de Dunnett (1-cola).</p> <p>⊗ No se cumple la condición de normalidad y/o homogeneidad de la varianza</p> <p>¹ W y B calculado, t y p calculadas correspondientes a los datos sin transformar (log(abs'+1)).</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|---|--------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,919 | | 0,924 | | 0,939 | | 0,941 | | 0,946 | | 0,947 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 8,43 | | 11,43 | | 13,04 | | 15,08 | | 15,50 | | 16,89 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L LAS | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 1,0 | 1,74 | 0,03 | 1,87 | 0,03 | 0,39 | 0,03 | 1,72 | 0,03 | 1,77 | 0,03 | 1,84 | 0,03 |
| 2,0 | 3,5(*) | 0,01 | 3,81(*) | 0,01 | 3,32(*) | 0,01 | 3,50(*) | 0,01 | 3,60(*) | 0,01 | 3,74(*) | 0,01 |
| 3,0 | 5,55 | 0,00 | 5,97 | 0,00 | 5,20 | 0,00 | 5,48 | 0,00 | 5,64 | 0,00 | 5,86 | 0,00 |
| 4,0 | 8,16 | 0,00 | 8,77 | 0,00 | 7,64 | 0,00 | 8,05 | 0,00 | 8,28 | 0,00 | 8,61 | 0,00 |
| 5,0 | 11,73 | 0,00 | 12,60 | 0,00 | 10,99 | 0,00 | 11,56 | 0,00 | 11,90 | 0,00 | 12,37 | 0,00 |
| 6,0 | --- | --- | 22,45 | 0,00 | 19,57 | 0,00 | 20,60 | 0,00 | 21,20 | 0,00 | 22,03 | 0,00 |
| 7,0 | --- | --- | --- | --- | 33,47 | 0,00 | 35,23 | 0,00 | 36,26 | 0,00 | 37,68 | 0,00 |
| 8,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 38,86 | 0,00 | 40,01 | 0,00 | 41,57 | 0,00 |
| 9,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 45,52 | 0,00 | 47,30 | 0,00 |
| 10,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 48,55 | 0,00 |
| MSD | 0,042 | | 0,039 | | 0,045 | | 0,044 | | 0,043 | | 0,042 | |
| % reducción | 6,13 | | 5,77 | | 6,70 | | 6,42 | | 6,28 | | 6,14 | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un α= 0,05 en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | | | | | |

Tabla A II.13.
Valores de ICp del ensayo de *D. salina* y LAS a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de LAS estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 1,1633 | 0,2182 | 0,7133 | 1,2030 | 1,7719 | 2,4414 | 0,2677 |
| | 25 | 4,5702 | 3,6682 | 4,1407 | 4,5794 | 5,0552 | 5,5886 | 0,2334 |
| | 50 | 5,9453 | 5,7989 | 5,8756 | 5,9431 | 6,0024 | 6,0653 | 0,0325 |
| | 75 | 6,6534 | 6,4903 | 6,5757 | 6,6558 | 6,7572 | 6,8713 | 0,0458 |
| | 95 | 7,8168 | 7,3384 | 7,5890 | 7,8037 | 7,9292 | 8,0527 | 0,0820 |
| 96 | 5 | 1,7436 | -0,9810 | 0,4462 | 1,6790 | 3,5506 | 5,5382 | 0,8950 |
| | 25 | 5,3368 | 5,2176 | 4,8038 | 5,2883 | 5,6559 | 6,0069 | 0,2136 |
| | 50 | 6,6926 | 6,2708 | 6,4917 | 6,6717 | 6,8531 | 7,0297 | 0,0945 |
| | 75 | 7,9047 | 7,4622 | 7,6940 | 7,9011 | 8,1206 | 8,3581 | 0,1161 |
| | 95 | 8,8648 | 8,6118 | 8,7443 | 8,8897 | 9,0658 | 9,2869 | 0,0957 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; DesvEst.: Desviación estándar

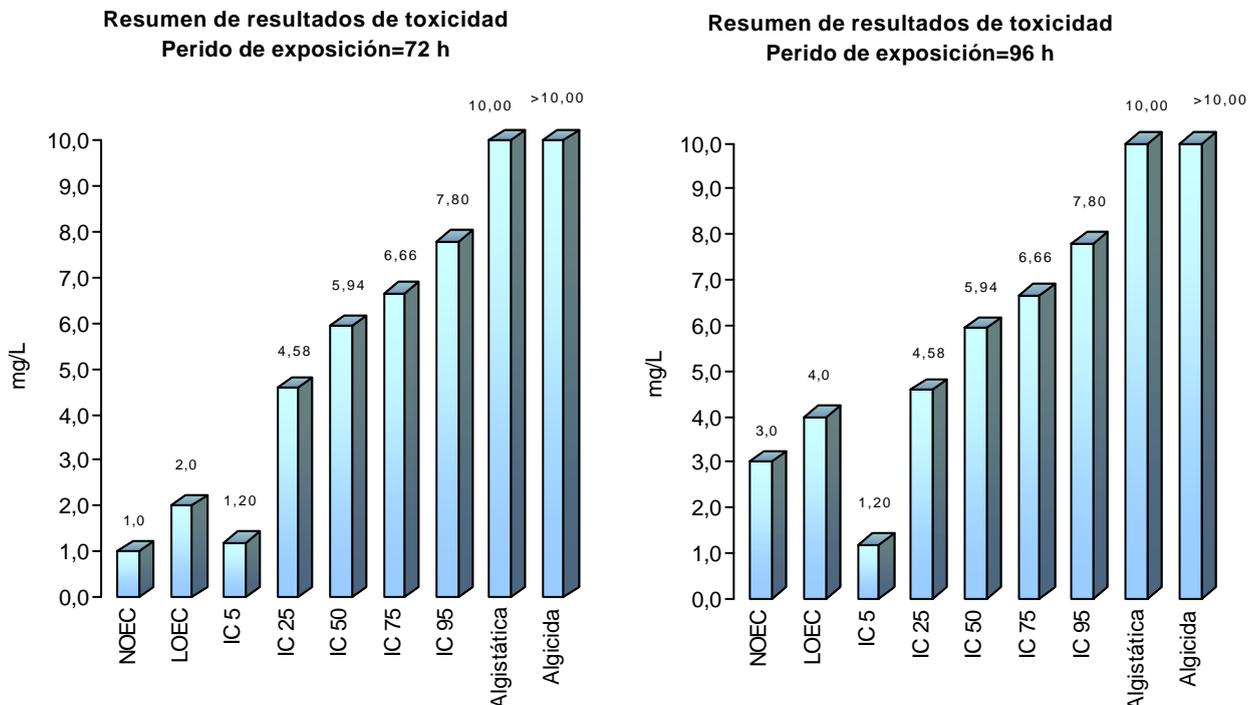
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las tres concentraciones más altas de LAS ensayadas con *D. salina* (8, 9 y 10 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa de los tres viales.

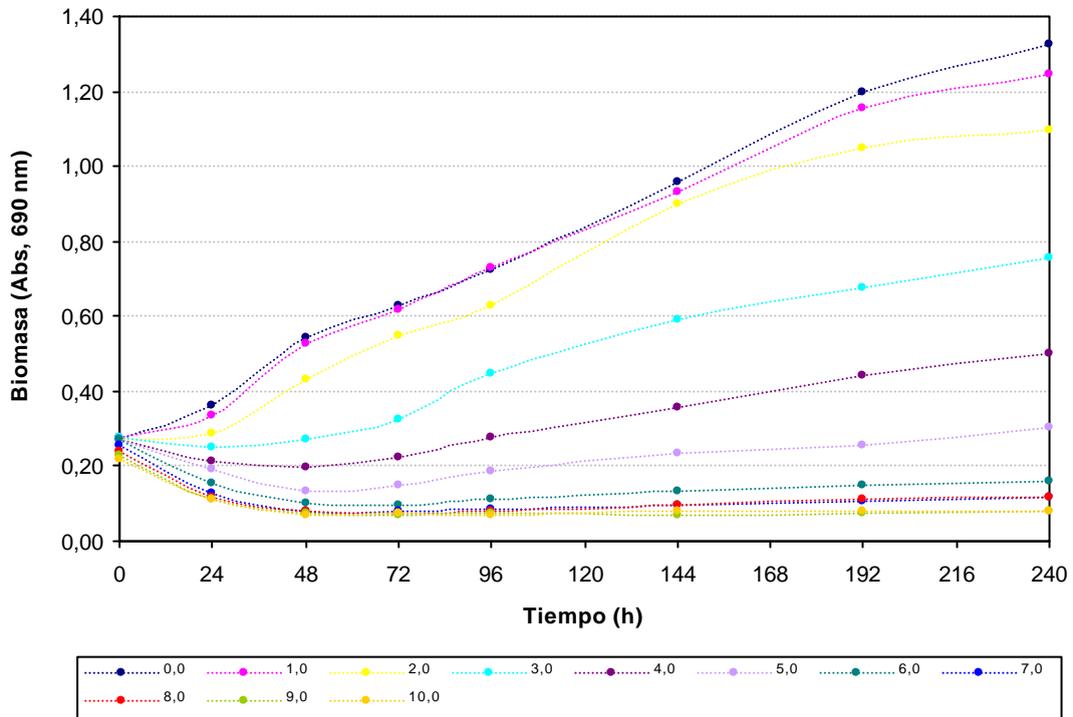
- Concentración alguistática= 10 mg/L
- Concentración alguicida= No se ha determinado experimentalmente

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

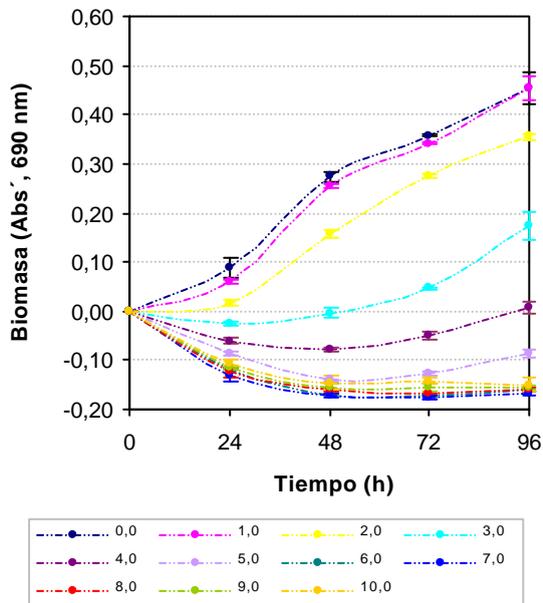
De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del LAS y *D. salina*.



Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

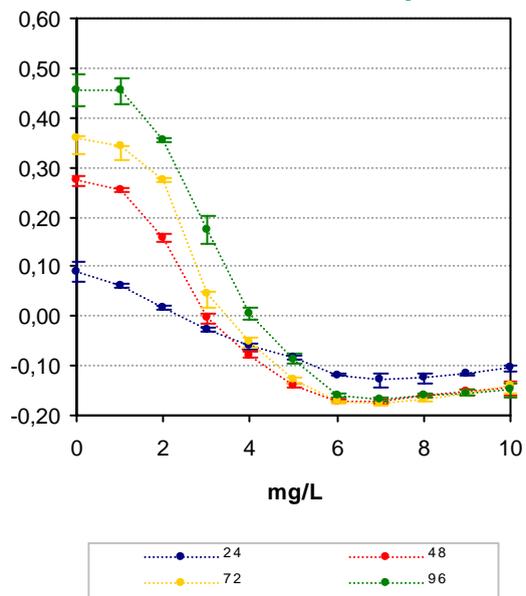


Tabla A II.16.

Valores de NOEC y LOEC experimentales obtenidos para *C. gracilis* expuesta a diferentes concentraciones de LAS.

| <i>C. gracilis</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas (**) | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,939 | | 0,972 | | 0,972 | | 0,974 | |
| B calculado | 17,23 | | 10,64 | | 10,57 | | 15,79 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L LAS | t _i | p |
| 1,0 | 3,85 (*) | 0,03998 | 3,36 (*) | 0,02098 | 4,64 (*) | 0,00069 | 0,06 | 0,48548 |
| 2,0 | 10,11 | 0,00190 | 19,73 | 0,00005 | 23,12 | 0,00001 | 6,32 (*) | 0,00272 |
| 3,0 | 16,38 | 0,00029 | 47,56 | 0,00000 | 86,63 | 0,00000 | 19,34 | 0,00017 |
| 4,0 | 21,23 | 0,00012 | 60,28 | 0,00000 | 114,02 | 0,00000 | 33,01 | 0,00001 |
| 5,0 | 24,60 | 0,00006 | 71,06 | 0,00000 | 135,00 | 0,00000 | 41,67 | 0,00000 |
| 6,0 | 29,35 | 0,00003 | 76,19 | 0,00000 | 147,81 | 0,00000 | 49,09 | 0,00000 |
| 7,0 | 30,96 | 0,00005 | 76,42 | 0,00000 | 148,46 | 0,00000 | 50,02 | 0,00000 |
| 8,0 | 30,34 | 0,00004 | 74,43 | 0,00000 | 146,24 | 0,00000 | 49,13 | 0,00000 |
| 9,0 | 29,11 | 0,00003 | 73,17 | 0,00000 | 143,17 | 0,00000 | 48,56 | 0,00000 |
| 10,0 | 27,59 | 0,00004 | 71,80 | 0,00000 | 139,09 | 0,00000 | 48,08 | 0,00000 |
| MSD | 0,019 | | 0,015 | | 0,009 | | 0,013 | |
| % reducción | 20,98 | | 5,63 | | 2,65 | | 7,87 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). ** Análisis estadístico realizado a partir de los datos transformados logarítmicamente ($\log(x+1)$). | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,978 | | 0,972 | | 0,979 | | 0,977 | | 0,966 | | 0,972 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 5,48 | | 6,69 | | 6,77 | | 8,56 | | 10,51 | | 10,57 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L LAS | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 1,0 | 4,70(*) | 0,00 | 4,99(*) | 0,00 | 5,07(*) | 0,00 | 5,33(*) | 0,00 | 4,70(*) | 0,00 | 4,64(*) | 0,00 |
| 2,0 | 23,39 | 0,00 | 24,83 | 0,00 | 25,25 | 0,00 | 26,54 | 0,00 | 23,42 | 0,00 | 23,12 | 0,00 |
| 3,0 | 87,64 | 0,00 | 93,03 | 0,00 | 94,61 | 0,00 | 99,46 | 0,00 | 87,77 | 0,00 | 86,63 | 0,00 |
| 4,0 | 115,35 | 0,00 | 122,45 | 0,00 | 124,52 | 0,00 | 130,91 | 0,00 | 115,52 | 0,00 | 114,02 | 0,00 |
| 5,0 | 136,58 | 0,00 | 144,99 | 0,00 | 147,44 | 0,00 | 155,00 | 0,00 | 136,78 | 0,00 | 135,00 | 0,00 |
| 6,0 | --- | --- | 158,75 | 0,00 | 161,44 | 0,00 | 169,71 | 0,00 | 149,76 | 0,00 | 147,81 | 0,00 |
| 7,0 | --- | --- | --- | --- | 162,15 | 0,00 | 170,45 | 0,00 | 150,42 | 0,00 | 148,46 | 0,00 |
| 8,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 167,90 | 0,00 | 148,16 | 0,00 | 146,24 | 0,00 |
| 9,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 145,06 | 0,00 | 143,17 | 0,00 |
| 10,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 139,09 | 0,00 |
| MSD | 0,009 | | 0,008 | | 0,008 | | 0,008 | | 0,009 | | 0,009 | |
| % reducción | 2,48 | | 2,36 | | 2,35 | | 2,26 | | 2,58 | | 2,65 | |
| * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | | | | | |

Tabla A II.17.
Valores de ICp del ensayo de *C. gracilis* LAS a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de LAS estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 1,0183 | 0,8001 | 0,9144 | 1,0122 | 1,0716 | 1,1301 | 0,0385 |
| | 25 | 2,0281 | 1,9869 | 2,0085 | 2,0280 | 2,0501 | 2,0742 | 0,0111 |
| | 50 | 2,4203 | 2,3938 | 2,4077 | 2,4203 | 2,4347 | 2,4504 | 0,0070 |
| | 75 | 2,8125 | 2,7963 | 2,8048 | 2,8127 | 2,8218 | 2,8320 | 0,0043 |
| | 95 | 3,6168 | 3,5870 | 3,6026 | 3,6164 | 3,6333 | 3,6515 | 0,0082 |
| 96 | 5 | 1,2208 | -0,0207 | 0,6296 | 1,1364 | 1,2661 | 1,3159 | 0,1656 |
| | 25 | 2,0780 | 1,6707 | 1,8841 | 2,0596 | 2,1575 | 2,2449 | 0,0627 |
| | 50 | 2,6998 | 2,4492 | 2,5805 | 2,6920 | 2,8124 | 2,9362 | 0,0614 |
| | 75 | 3,3532 | 3,0658 | 3,2163 | 3,3435 | 3,4410 | 3,5375 | 0,0577 |
| | 95 | 3,8995 | 3,8015 | 3,8528 | 3,9006 | 3,9524 | 4,0106 | 0,0271 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

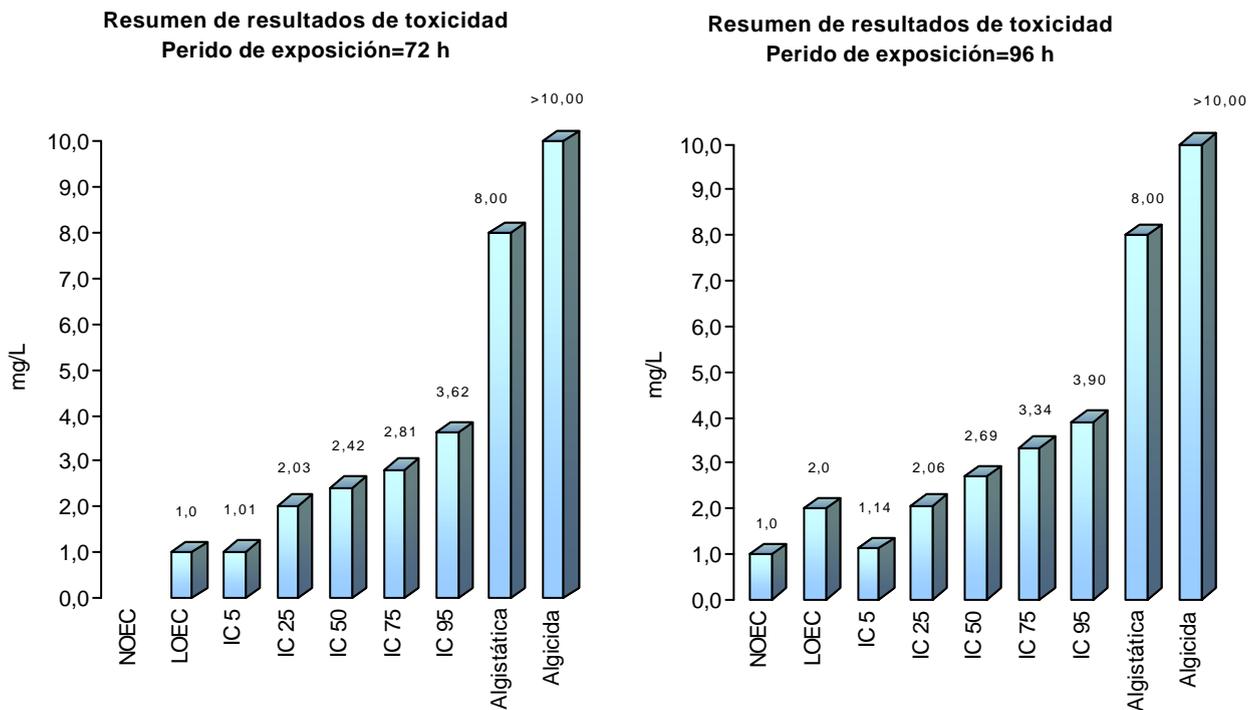
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las tres concentraciones más altas de LAS ensayadas con *C. gracilis* (8, 9 y 10 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un ligero aumento de la biomasa en 8 mg/L, una ligera subida de turbidez en 9 mg/L, y no se observó ningún cambio en la turbidez del vial de 10 mg/L.

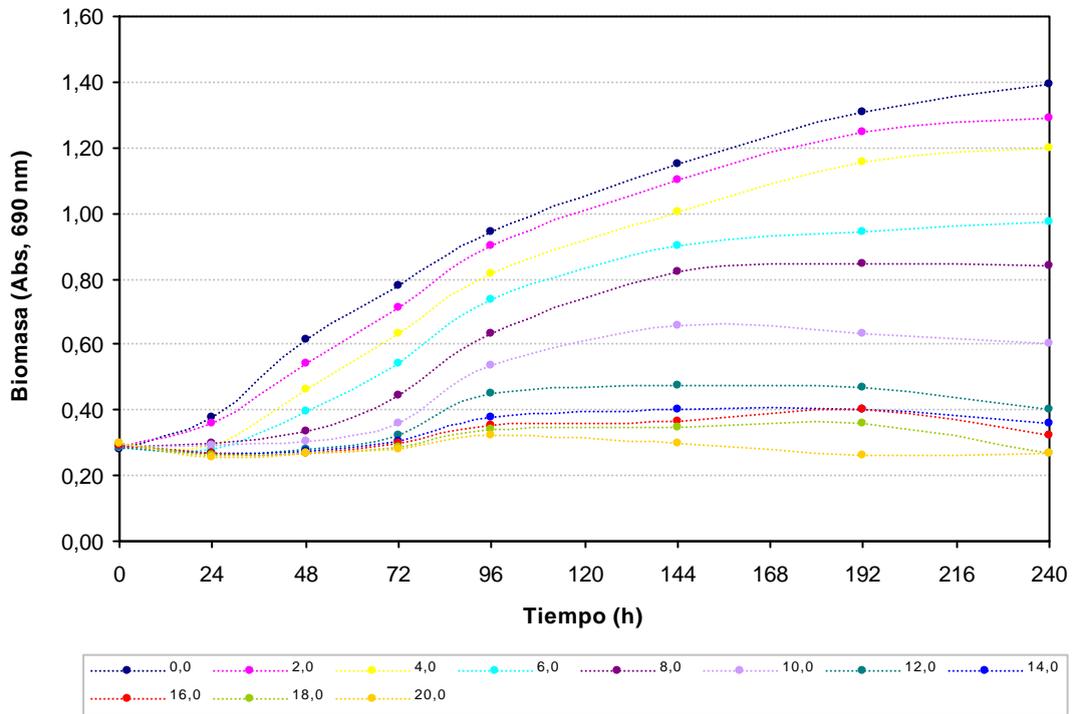
- Concentración alguistática= 8 mg/L
- Concentración alguicida= 10 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

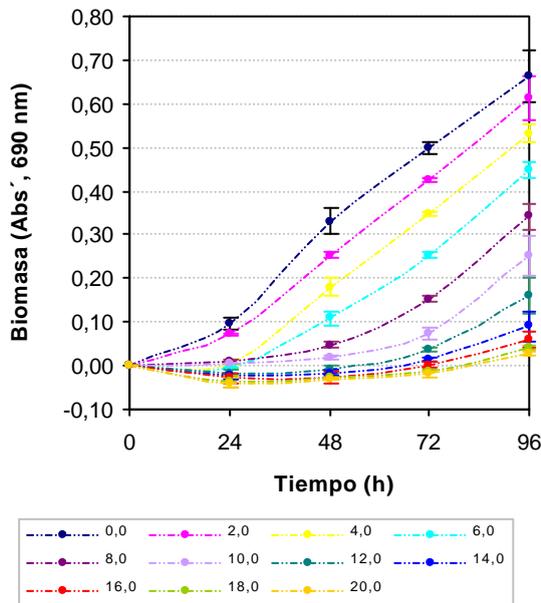
De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del LAS y *C. gracilis*.



Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

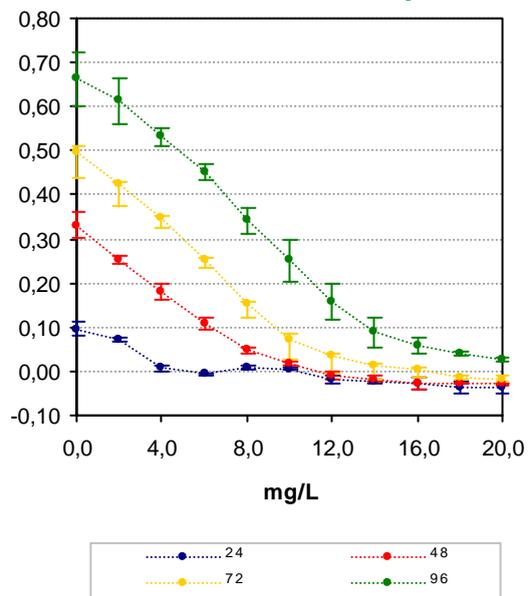


Tabla A II.20.

Valores de NOEC y LOEC experimentales obtenidos para *T. chuii* expuesta a diferentes concentraciones de LAS.

| <i>T. chuii</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|--|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,961 | | 0,973 | | 0,977 | | 0,960 | |
| B calculado | 13,31 | | 15,09 | | 10,30 | | 14,60 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L LAS | t _i | p |
| 2,0 | 3,37 (*) | 0,02173 | 10,51 (*) | 0,00034 | 12,43 (*) | 0,00045 | 1,79 | 0,16314 |
| 4,0 | 12,04 | 0,00033 | 18,76 | 0,00017 | 25,42 | 0,00003 | 4,67 (*) | 0,01135 |
| 6,0 | 13,89 | 0,00013 | 27,09 | 0,00002 | 41,22 | 0,00000 | 7,54 | 0,00206 |
| 8,0 | 11,86 | 0,00027 | 34,01 | 0,00000 | 58,32 | 0,00000 | 11,35 | 0,00059 |
| 10,0 | 12,27 | 0,00022 | 37,37 | 0,00000 | 71,59 | 0,00000 | 14,57 | 0,00035 |
| 12,0 | 15,60 | 0,00016 | 40,51 | 0,00000 | 77,95 | 0,00000 | 17,81 | 0,00014 |
| 14,0 | 16,09 | 0,00010 | 41,39 | 0,00000 | 81,55 | 0,00000 | 20,27 | 0,00007 |
| 16,0 | 16,81 | 0,00017 | 42,57 | 0,00000 | 83,63 | 0,00000 | 21,37 | 0,00004 |
| 18,0 | 17,98 | 0,00018 | 42,69 | 0,00000 | 86,16 | 0,00000 | 22,02 | 0,00003 |
| 20,0 | 18,16 | 0,00011 | 42,88 | 0,00000 | 87,23 | 0,00000 | 22,47 | 0,00003 |
| MSD | 0,020 | | 0,023 | | 0,016 | | 0,075 | |
| % reducción | 20,33 | | 6,69 | | 3,14 | | 11,26 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,959 | | 0,960 | | 0,962 | | 0,971 | | 0,970 | | 0,977 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 3,61 | | 5,15 | | 6,49 | | 6,55 | | 10,29 | | 10,30 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L LAS | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| 2,0 | 10,38(*) | 0,00 | 11,06(*) | 0,00 | 11,66(*) | 0,00 | 11,78(*) | 0,00 | 12,39(*) | 0,00 | 12,43(*) | 0,00 |
| 4,0 | 21,23 | 0,00 | 22,62 | 0,00 | 23,86 | 0,00 | 24,09 | 0,00 | 25,34 | 0,00 | 25,42 | 0,00 |
| 6,0 | 34,43 | 0,00 | 36,69 | 0,00 | 38,69 | 0,00 | 39,07 | 0,00 | 41,09 | 0,00 | 41,22 | 0,00 |
| 8,0 | 48,70 | 0,00 | 51,91 | 0,00 | 54,73 | 0,00 | 55,27 | 0,00 | 58,13 | 0,00 | 58,32 | 0,00 |
| 10,0 | 59,79 | 0,00 | 63,72 | 0,00 | 67,19 | 0,00 | 67,85 | 0,00 | 71,36 | 0,00 | 71,59 | 0,00 |
| 12,0 | --- | --- | 69,37 | 0,00 | 73,15 | 0,00 | 73,87 | 0,00 | 77,70 | 0,00 | 77,95 | 0,00 |
| 14,0 | --- | --- | --- | --- | 76,53 | 0,00 | 77,29 | 0,00 | 81,29 | 0,00 | 81,55 | 0,00 |
| 16,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 79,26 | 0,00 | 83,36 | 0,00 | 83,63 | 0,00 |
| 18,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 85,88 | 0,00 | 86,16 | 0,00 |
| 20,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 87,23 | 0,00 |
| MSD | 0,018 | | 0,017 | | 0,016 | | 0,016 | | 0,015 | | 0,016 | |
| % reducción | 3,56 | | 3,38 | | 3,24 | | 3,24 | | 3,10 | | 3,14 | |
| * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | | | | | |

Tabla A II.21.
Valores de ICp del ensayo de *T. chuii* y LAS a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de LAS estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,6765 | 0,4939 | 0,5895 | 0,6845 | 0,8027 | 0,9417 | 0,0557 |
| | 25 | 3,3225 | 2,7748 | 3,0617 | 3,3230 | 3,5636 | 3,8288 | 0,1354 |
| | 50 | 6,0954 | 5,7500 | 2,9309 | 6,0954 | 6,2381 | 6,3951 | 0,0797 |
| | 75 | 8,7140 | 8,4228 | 8,5753 | 8,7204 | 8,8910 | 9,0856 | 0,0808 |
| | 95 | 13,0703 | 12,6106 | 12,8514 | 13,0754 | 13,2850 | 13,5212 | 0,1111 |
| 96 | 5 | 1,3086 | -0,2456 | 0,5685 | 1,5032 | 2,6864 | 4,2020 | 0,6882 |
| | 25 | 4,8299 | 2,4299 | 3,6871 | 4,8073 | 5,8431 | 6,9576 | 0,5652 |
| | 50 | 8,2308 | 6,8267 | 7,5622 | 8,2229 | 9,0208 | 9,8898 | 0,3760 |
| | 75 | 11,8600 | 10,5422 | 11,2325 | 11,8967 | 12,7200 | 13,6659 | 0,4055 |
| | 95 | 19,1342 | (**) | (**) | 19,1037 | (**) | (**) | 0,3499 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

(**) No es posible calcular límites de confianza

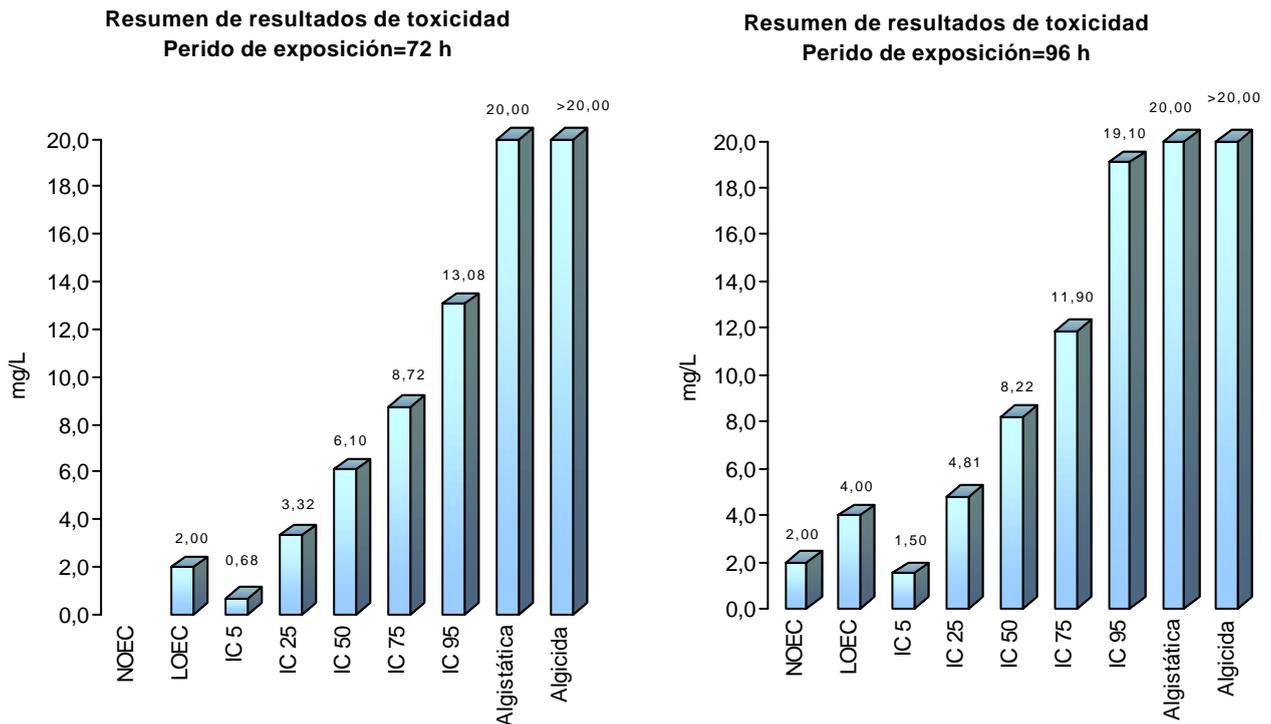
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las tres concentraciones más altas de LAS ensayadas con *T. chuii* (16, 18 y 20 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa de los tres viales.

- Concentración alguistática= 20 mg/L
- Concentración alguicida= No determinado experimentalmente

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD CON MICROALGAS

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del LAS y *T. chuii*.



3. RESULTADOS CON ARTEMIA

3.1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Recipiente de ensayo: placas petri de vidrio
- N° de réplicas: 5 para cada concentración y control
- N° de organismos por placa: 10
- Volumen de las placas: 30 mL
- Volumen de solución de ensayo: 20 mL
- Agua de dilución: agua de mar sintética
- Medio nutriente adicional: no
- Temperatura de ensayo: $20 \pm 0,1$ °C
- Iluminación: no, oscuridad
- Aireación: no
- Duración del ensayo: 3 días
- Respuesta observada: mortalidad, inhibición en la capacidad natatoria

ORGANISMOS DE ENSAYO

- *Artemia franciscana*, código 1309 según clasificación del Instituto de la *Artemia*, Bélgica obtenidos a partir de la eclosión de quistes de resistencia en condiciones óptimas de luz (iluminación constante), aireación (continua) y temperatura ($20 \pm 0,1$ °C).
- Nauplios de una misma cohorte de *Artemia franciscana* de entre 6 a 12 horas de vida (estadio I)

RESULTADOS OBTENIDOS

- Número de supervivientes a las 24, 48 y 72 horas de ensayo
- LC_p mediante el método Probit

3.2 RESULTADOS OBTENIDOS

Tabla A II.22.
Ensayos de toxicidad aguda con *Artemia*. Ensayo de LAS

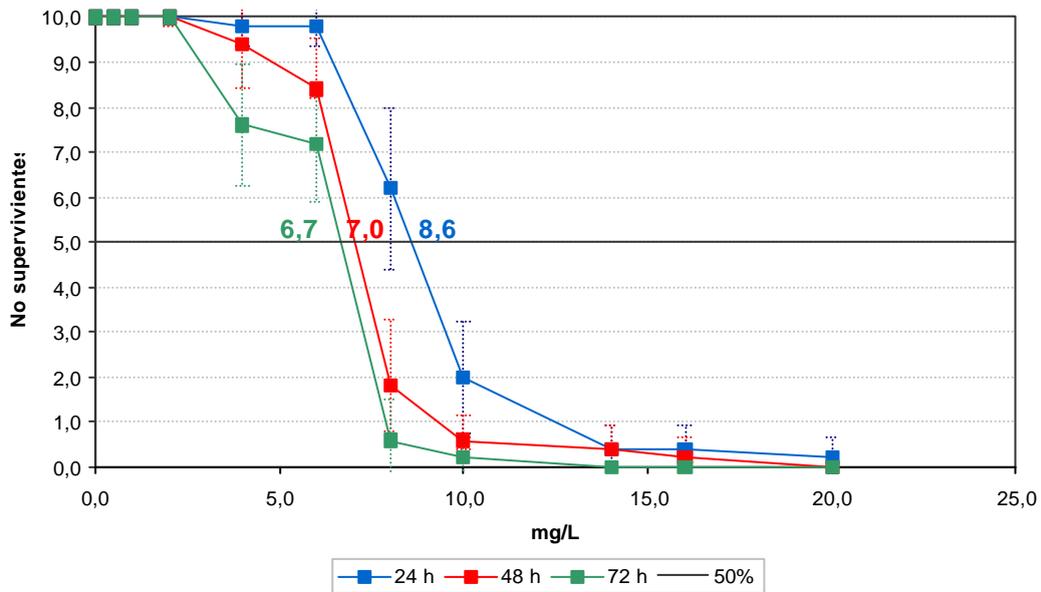
| mg/L LAS | 24 h | | | 48 h | | | 72 h | | | N Total |
|----------------|------|---|----|------|---|----|------|---|----|---------|
| | + | ± | - | + | ± | - | + | ± | - | |
| Control | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| 0,5 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| 1,0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 9 | 1 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| 2,0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 9 | 1 | 0 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| 4,0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 8 | 1 | 1 | 10 |
| | 9 | 0 | 0 | 7 | 3 | 0 | 7 | 0 | 3 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 9 | 0 | 1 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 8 | 1 | 1 | 6 | 0 | 4 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 7 | 1 | 2 | 7 | 0 | 3 | 10 |
| 6,0 | 9 | 0 | 1 | 7 | 0 | 3 | 7 | 0 | 3 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 9 | 0 | 1 | 8 | 0 | 2 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 9 | 1 | 0 | 8 | 1 | 1 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 8 | 0 | 2 | 6 | 0 | 4 | 10 |
| | 9 | 1 | 0 | 8 | 0 | 2 | 5 | 1 | 4 | 10 |
| 8,0 | 6 | 3 | 1 | 3 | 1 | 6 | 2 | 0 | 8 | 10 |
| | 4 | 1 | 5 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 5 | 2 | 3 | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 5 | 0 | 5 | 1 | 1 | 8 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| | 5 | 0 | 5 | 0 | 2 | 8 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| 10,0 | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 1 | 1 | 8 | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 2 | 8 | 1 | 0 | 9 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 2 | 2 | 8 | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| 14,0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 1 | 0 | 9 | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 0 | 10 | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| 16,0 | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 1 | 0 | 9 | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| 20,0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |

Tabla A II.23.
Promedios de supervivientes. Ensayo de LAS

| mg/L LAS | 24 h | | 48 h | | 72 h | | Promedio DesvEst |
|----------|---------|------|---------|------|---------|------|---------------------|
| | + Total | ± | + Total | ± | + Total | ± | |
| 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 0,5 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 1,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,2 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,45 | |
| 2,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,2 | 10,0 | 0,4 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,45 | 0,00 | 0,89 | |
| 4,0 | 9,8 | 0,0 | 9,4 | 1,0 | 7,6 | 0,2 | Promedio DesvEst |
| | 0,45 | 0,00 | 0,89 | 1,22 | 1,34 | 0,45 | |
| 6,0 | 9,8 | 0,2 | 8,4 | 0,2 | 7,2 | 0,4 | Promedio DesvEst |
| | 0,45 | 0,45 | 1,14 | 0,45 | 1,30 | 0,55 | |
| 8,0 | 6,2 | 1,2 | 1,8 | 1,0 | 0,6 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 1,79 | 1,30 | 1,48 | 0,71 | 0,89 | 0,00 | |
| 10,0 | 2,0 | 1,0 | 0,6 | 0,2 | 0,2 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 1,22 | 1,00 | 0,55 | 0,45 | 0,45 | 0,00 | |
| 14,0 | 0,4 | 0,0 | 0,4 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,55 | 0,00 | 0,55 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 16,0 | 0,4 | 0,0 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,55 | 0,00 | 0,45 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 20,0 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,45 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |

+ Total: Número total de supervivientes; ±: Número de organismos que presentan un descenso en la capacidad natatoria

Variación del número de supervivientes



Las concentraciones incluidas en la zona interior del gráfico muestran los valores de LC₅₀ obtenidos mediante el método de interpolación gráfica

Tabla A II.24.
Resultados obtenidos mediante el método PROBIT

| Ensayo de 24 h | Concentración estimada de LAS (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|--------------------------------------|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 4,325 | 2,881 | 5,334 |
| LC/EC 5,00 | 5,295 | 3,892 | 6,248 |
| LC/EC 10,00 | 5,897 | 4,559 | 6,814 |
| LC/EC 15,00 | 6,342 | 5,063 | 7,236 |
| LC/EC 50,00 | 8,625 | 7,630 | 9,649 |
| LC/EC 85,00 | 11,730 | 10,397 | 14,230 |
| LC/EC 90,00 | 12,615 | 11,065 | 15,773 |
| LC/EC 95,00 | 14,051 | 12,091 | 18,435 |
| LC/EC 99,00 | 17,199 | 14,189 | 24,855 |

χ^2 calculado=29,052; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados hay que interpretarlos con precaución

| Ensayo de 48 h | Concentración estimada de LAS (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|--------------------------------------|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 3,334 | 2,077 | 4,215 |
| LC/EC 5,00 | 4,129 | 2,880 | 4,970 |
| LC/EC 10,00 | 4,628 | 3,421 | 5,439 |
| LC/EC 15,00 | 4,998 | 3,836 | 5,789 |
| LC/EC 50,00 | 6,918 | 6,022 | 7,790 |
| LC/EC 85,00 | 9,577 | 8,440 | 11,742 |
| LC/EC 90,00 | 10,343 | 9,017 | 13,117 |
| LC/EC 95,00 | 11,592 | 9,903 | 15,524 |
| LC/EC 99,00 | 14,356 | 11,717 | 21,455 |

χ^2 calculado=19,675; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados hay que interpretarlos con precaución

| Ensayo de 72 h | Concentración estimada de LAS (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|--------------------------------------|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 2,731 | 1,416 | 3,610 |
| LC/EC 5,00 | 3,397 | 2,056 | 4,242 |
| LC/EC 10,00 | 3,816 | 2,503 | 4,634 |
| LC/EC 15,00 | 4,128 | 2,853 | 4,928 |
| LC/EC 50,00 | 5,753 | 4,780 | 6,632 |
| LC/EC 85,00 | 8,017 | 6,928 | 10,318 |
| LC/EC 90,00 | 8,672 | 7,417 | 11,682 |
| LC/EC 95,00 | 9,742 | 8,156 | 14,129 |
| LC/EC 99,00 | 12,118 | 9,640 | 20,402 |

χ^2 calculado=24,642; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados hay que interpretarlos con precaución

4. ENSAYOS CON BACTERIAS LUMINISCENTES

4.1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Condiciones del ensayo LUMISTOX
- N° de réplicas: 2 para cada concentración y control
- Duración del ensayo: 30 minutos
- Respuesta observada: luminiscencia de las bacterias

ORGANISMOS DE ENSAYO

- Bacterias luminiscentes proporcionadas por la marca comercial *Dr. Lange* para el ensayo de LUMISTOX

RESULTADOS OBTENIDOS

- Inhibición de la luminiscencia a t=15 min, y t=30 min.

4.2. RESULTADOS OBTENIDOS

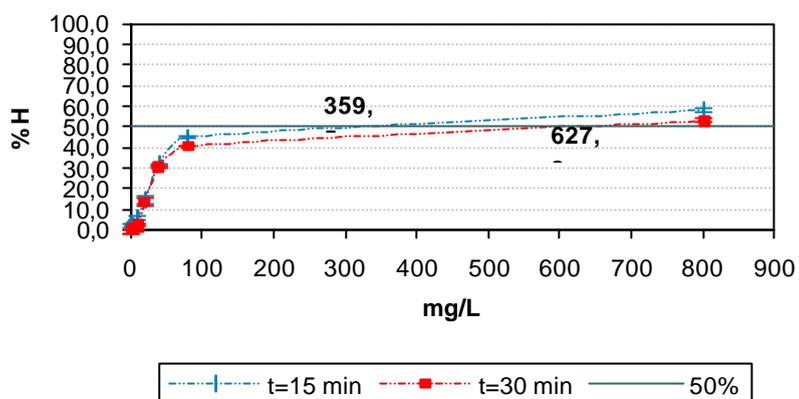
Tabla A II.25.
Resultados obtenidos en el ensayo de bacterias luminiscentes y LAS

| mg/L | Luminiscencia | | | t=15 min | | | t=30 min | | |
|----------|---------------|-------|-------|----------|------|----------|----------|------|-------|
| | t=0 | t=15 | t=30 | Icorr | %H | Gamma | Icorr | %H | Gamma |
| 802,00 | 719,7 | 335,8 | 374,4 | 802,6 | 58,2 | 1,4 | 797,1 | 53,0 | 1,1 |
| | 737,5 | 345,2 | 383,8 | 822,4 | 58,0 | 1,4 | 816,8 | 53,0 | 1,1 |
| 80,20 | 721,7 | 447,8 | 480,1 | 804,8 | 44,4 | 0,8 | 799,3 | 39,9 | 0,7 |
| | 754,3 | 459,1 | 491,9 | 841,1 | 45,4 | 0,8 | 835,4 | 41,1 | 0,7 |
| 40,10 | 733,8 | 560,7 | 570,9 | 818,3 | 31,5 | 0,5 | 812,7 | 29,8 | 0,4 |
| | 750,6 | 569,1 | 579,7 | 837,0 | 32,0 | 0,5 | 831,3 | 30,3 | 0,4 |
| 20,05 | 747,6 | 712,4 | 713,1 | 833,7 | 14,5 | 0,2 | 828,0 | 13,9 | 0,2 |
| | 746,1 | 716,1 | 717,5 | 832,0 | 13,9 | 0,2 | 826,3 | 13,2 | 0,2 |
| 10,03 | 741,4 | 791,5 | 817,6 | 826,8 | 4,3 | 0,0 | 821,1 | 0,4 | 0,0 |
| | 770,3 | 795,4 | 823,0 | 859,0 | 7,4 | 0,1 | 853,1 | 3,5 | 0,0 |
| 5,01 | 771,2 | 837,5 | 855,6 | 860,0 | 2,6 | 0,0 | 854,1 | -0,2 | 0,0 |
| | 773,6 | 846,8 | 862,4 | 862,7 | 1,8 | 0,0 | 856,8 | -0,7 | 0,0 |
| 2,50 | 770,5 | 846,9 | 859,3 | 859,2 | 1,4 | 0,0 | 853,4 | -0,7 | 0,0 |
| | 778,9 | 842,1 | 857,0 | 868,6 | 3,0 | 0,0 | 862,7 | 0,7 | 0,0 |
| 1,25 | 785,5 | 863,3 | 891,2 | 875,9 | 1,4 | 0,0 | 870,0 | -2,4 | 0,0 |
| | 793,0 | 869,8 | 896,9 | 884,3 | 1,6 | 0,0 | 878,3 | -2,1 | 0,0 |
| 0,0 | 799,8 | 885,9 | 885,2 | 891,9 | 0,7 | 0,0 | 885,8 | 0,1 | 0,0 |
| | 789,5 | 886,3 | 875,0 | 880,4 | -0,7 | 0,0 | 874,4 | -0,1 | 0,0 |
| KF=1,115 | | | | | | KF=1,108 | | | |

Tabla A II.26.
Promedio de los valores de %H del ensayo de LAS

| | mg/L LAS | | | | | | | | | |
|----------|----------|------|------|------|-------|-------|-------|-------|--------|----------|
| | 0,00 | 1,25 | 2,50 | 5,01 | 10,03 | 20,05 | 40,10 | 80,20 | 802,00 | |
| t=15 min | 0,0 | 1,5 | 2,2 | 2,2 | 5,8 | 14,2 | 31,7 | 44,9 | 58,1 | Promedio |
| | 0,95 | 0,14 | 1,14 | 0,55 | 2,22 | 0,44 | 0,37 | 0,75 | 0,09 | DesvEst |
| t=30 min | 0,0 | -2,3 | 0,0 | -0,4 | 2,0 | 13,5 | 30,0 | 40,5 | 53,0 | Promedio |
| | 0,10 | 0,23 | 0,96 | 0,34 | 2,19 | 0,50 | 0,36 | 0,84 | 0,01 | DesvEst |

Variación del porcentaje de inhibición con la concentración de ensayo



Las concentraciones incluidas en la zona interior del gráfico muestran los valores de LC₅₀ obtenidos mediante el método de interpolación gráfica

Tabla A II.27.
Valores de EC(p) calculados mediante interpolación gráfica

| LAS (mg/L) | t=15 min | t=30 min |
|------------------|----------|----------|
| EC ₅ | 13,62 | 15,85 |
| EC ₂₅ | 44,2 | 51,59 |
| EC ₅₀ | 359,5 | 627,8 |

5. OBJETIVOS DE CALIDAD DEL LAS. TABLAS DE CÁLCULO. RESULTADOS

Tabla A II.28. Tabla resumen de los resultados de toxicidad más sensibles (Fact. Seg.=100)

| Resumen de resultados más sensibles de cada grupo de organismos | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos del presente estudio | | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos de toxicidad en agua de mar | | | Valor mínimo obtenidos a partir de la base de datos de toxicidad acuática | | |
|---|---------------------------|---|-------|---------|--|-------|---------|---|-------|--------|
| | | Nº datos | mg/L | x FS | Nº datos | mg/L | x FS | Nº datos | mg/L | x FS |
| Microalgas | NOEC (≤ 96 h) | 5 | 1,0 | 0,01 | 5 | 1,0 | 0,01 | 5 | 1,0 | 0,010 |
| | LOEC (≤ 96 h) | 10 | 1,0 | 0,01 | 10 | 1,0 | 0,01 | 10 | 1,0 | 0,010 |
| | IC ₅₀ (≤ 96 h) | 9 | 2,420 | 0,02420 | 15 | 2,150 | 0,02150 | 21 | 0,900 | 0,009 |
| Crustáceos | EC ₅₀ (≤ 96 h) | 6 | 5,753 | 0,05753 | 9 | 1,420 | 0,01420 | 26 | 0,110 | 0,0011 |
| | EC ₅₀ (21 d) | | | | | | | 4 | 1,110 | 0,111 |
| Otros invertebrados | NOEC (≤ 96 h) | | | | | | | 1 | 1 | 0,010 |
| | LOEC (≤ 96 h) | | | | | | | 1 | 4,7 | 0,047 |
| | EC ₅₀ (≤ 96 h) | | | | 3 | 1 | 0,010 | 4 | 1 | 0,010 |
| Peces | NOEC (30 d) | | | | | | | 6 | 0,1 | 0,01 |
| | LOEC (≤ 96 h) | | | | | | | 1 | 2,19 | 0,0219 |
| | LOEC (30 d) | | | | | | | 6 | 0,25 | 0,025 |
| | EC ₅₀ (≤ 96 h) | | | | 9 | 0,2 | 0,002 | 16 | 0,2 | 0,020 |

Tabla A II.29. Valores ecotoxicológicos obtenidos a partir de los valores L(E)C₅₀

| Valor guía obtenido a partir de los valores de L(E)C ₅₀ | Grupo de organismos | Tipo de Respuesta (Aguda o Crónica) | n _i , N | w _i = n _i /N | q _i = Conc· F S | w _i x q _i | Valor Guía = $\sum_{i=1}^n q_i \cdot w_i$ |
|--|---------------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|---|
| Base de datos de toxicidad de este estudio | Algas | A | 9 | 0,6000 | 0,0242 | 0,0145 | 0,0375 mg/L LAS |
| | Crustáceos | A | 6 | 0,4000 | 0,0575 | 0,0230 | |
| | N total de datos | | 15 | | | | |
| Base de datos de toxicidad en agua de mar | Algas | A | 15 | 0,4167 | 0,0215 | 0,0090 | 0,0138 mg/L LAS |
| | Crustáceos | A | 9 | 0,2500 | 0,0142 | 0,0036 | |
| | Otros invertebrados | A | 3 | 0,0833 | 0,0100 | 0,0008 | |
| | Peces | A | 9 | 0,2500 | 0,0020 | 0,0005 | |
| N total de datos | | 36 | | | | | |
| Base de toxicidad acuática | Algas | A | 21 | 0,2958 | 0,0090 | 0,0027 | 0,0144 mg/L LAS |
| | Crustáceos | A | 26 | 0,3662 | 0,0011 | 0,0004 | |
| | Crustáceos | C | 4 | 0,0563 | 0,111 | 0,0063 | |
| | Otros invertebrados | A | 4 | 0,0563 | 0,0100 | 0,0006 | |
| | Peces | A | 16 | 0,2254 | 0,0200 | 0,0045 | |
| N total de datos | | 71 | | | | | |

Tabla A II.30. Valores ecotoxicológicos obtenidos a partir de los valores NOEC/LOEC

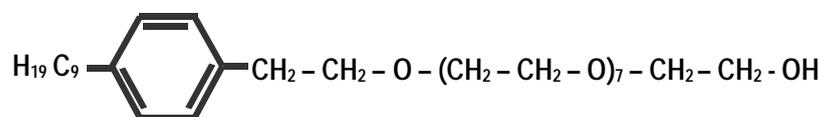
| Valor guía obtenido a partir de los valores NOEC/LOEC | Grupo de organismos | Tipo de Respuesta (Aguda o Crónica) | n _i , N | w _i = n _i /N | q _i = Conc· F S | w _i x q _i | Valor Guía = $\sum_{i=1}^n q_i \cdot w_i$ |
|---|---------------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|---|
| Base de datos de toxicidad de este estudio | Algas | A (NOEC) | 5 | 0,3333 | 0,010 | 0,0033 | 0,0100 mg/L LAS |
| | Algas | A (LOEC) | 10 | 0,6667 | 0,010 | 0,0067 | |
| | N total de datos | | 15 | | | | |
| Base de datos de toxicidad en agua de mar | Algas | A (NOEC) | 5 | 0,3333 | 0,010 | 0,0033 | 0,0100 mg/L LAS |
| | Algas | A (LOEC) | 10 | 0,6667 | 0,010 | 0,0067 | |
| | N total de datos | | 15 | | | | |
| Base de toxicidad acuática | Algas | A (NOEC) | 5 | 0,1667 | 0,0100 | 0,0017 | 0,0146 mg/L LAS |
| | Algas | A (LOEC) | 10 | 0,3333 | 0,0100 | 0,0033 | |
| | Otros crustáceos | A (NOEC) | 1 | 0,0333 | 0,0100 | 0,0003 | |
| | Otros crustáceos | A (LOEC) | 1 | 0,0333 | 0,0470 | 0,0016 | |
| | Peces | C (LOEC) | 6 | 0,2000 | 0,0100 | 0,0020 | |
| | Peces | A (LOEC) | 1 | 0,0333 | 0,0219 | 0,0007 | |
| | Peces | C (LOEC) | 6 | 0,2000 | 0,0250 | 0,0050 | |
| N total de datos | | 30 | | | | | |

ANEXO III. NONILFENOL NONIETOXILADO

1. DATOS DE REFERENCIA

1.1. PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS

- Tensioactivo no-iónico
- Suministro: Fluka Chemie A. G.
- Nombre del producto: nonoxinol-9; Tergitol NP-9
- Número del producto (Registro CAS): 26027-38-3
- Fórmula empírica: $C_{15}H_{24}O [C_2H_4O]_9$
- Fórmula estructural:



- Peso molecular: 617,6 g/mol
- Apariencia: líquido incoloro

1.2. DATOS DE TOXICIDAD DE REFERENCIA

La siguiente tabla muestra algunos resultados de toxicidad obtenidos de la bibliografía:

Tabla A III.1a.

Datos de toxicidad del NP9EO en algunos grupos de organismos. Algas

| <i>Especies</i> | <i>Medio</i> | <i>Tiempo Exposición (h)</i> | <i>Expresión de toxicidad</i> | <i>NP9EO (mg/L)</i> | <i>Referencia</i> |
|----------------------------------|--------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| <i>Selenastrum capricornutum</i> | Agua dulce | 96 | IC50 | 12 | Dorn et al. (1993); Naylor (1995) |
| <i>Selenastrum capricornutum</i> | Agua dulce | | NOEC | 8 | Dorn et al. (1993); Naylor (1995) |
| <i>Selenastrum capricornutum</i> | Agua dulce | 96 | IC50 | 12 | Lewis (1986) |
| <i>Selenastrum capricornutum</i> | Agua dulce | 96 | IC50 | 50 | Lewis (1986) |
| <i>Selenastrum capricornutum</i> | Agua dulce | 5 d | IC50 | 100 | Nyberg (1988) |
| <i>Selenastrum capricornutum</i> | Agua dulce | 21 d | IC50 | 500 | Nyberg (1988) |

Tabla A III.1b.

Datos de toxicidad del NP9EO en algunos grupos de organismos. Crustáceos

| <i>Especies</i> | <i>Medio</i> | <i>Tiempo Exposición (h)</i> | <i>Expresión de toxicidad</i> | <i>NP9EO (mg/L)</i> | <i>Referencia</i> |
|----------------------|--------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| <i>Daphnia magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 14 | Dorn et al. (1993); Naylor (1995) |
| <i>Daphnia magna</i> | Agua dulce | 48 | LC50 | 14 | Talmage (1994); Dorn et al. (1993) |
| <i>Daphnia magna</i> | Agua dulce | 7 d | NOEC | 10 | Dorn et al. (1993) |

Tabla A III.1c.

Datos de toxicidad del NP9EO en algunos grupos de organismos. Peces

| <i>Especies</i> | <i>Medio</i> | <i>Tiempo Exposición (h)</i> | <i>Expresión de toxicidad</i> | <i>NP9EO (mg/L)</i> | <i>Referencia</i> |
|----------------------------|--------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------|------------------------------------|
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 48 | LC50 | 18 | OECD (1997) |
| <i>Lepomis macrochirus</i> | Agua dulce | 96 | LC50 | 7,9 | Macek y Krzeminiski (1975) |
| <i>Leuciscus idus</i> | Agua dulce | 48 | LC50 | 7 | OECD (1997) |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 96 | NOEC | 1 | Dorn et al. (1993) |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 96 | LC50 | 1,6 | OECD (1997) |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 7 d | NOEC | 1,8 | Dorn et al. (1993) |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 96 | LC50 | 4,6 | Dorn et al. (1993) |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 96 | LC50 | 6,6 | Williams et al. (1996) |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 96 | LC50 | 46 | Talmage (1994); Dorn et al. (1993) |

2. ENSAYOS DE MICROALGAS MARINAS

RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Volumen de los viales de ensayo: 15 mL
- Volumen de solución de ensayo: 4 mL
- Agua de dilución: agua de mar sintética
- Medio nutriente adicional: si, medio f/2
- Temperatura de ensayo: $20 \pm 0,1$ °C
- Iluminación: constante, 11000 lux
- Aireación: diaria -de forma manual-
- Duración del ensayo: 10 días (+ 10 para el estudio de la concentración alguistática y alguicida)
- Medidas de biomasa: turbidez, a $\lambda = 690$ nm

MICROALGAS ENSAYADAS

- *Nannochloropsis gaditana*
- *Isochrysis galbana*
- *Dunaliella salina*
- *Chaetoceros gracilis*
- *Tetraselmis chuii*

RESULTADOS OBTENIDOS

- Valores de biomasa (Abs, 690 nm) de cada tratamiento
- Valores experimentales de NOEC y LOEC
- Valores experimentales de inhibición calculados a partir del ICp programa (Las indicaciones inferiores de las tablas (*) y (**)) están referidas a indicaciones realizadas por el programa
- Concentraciones alguistáticas y alguicidas experimentales

2.1. *Nannochloropsis gaditana*

Tabla A III.2.

Evolución de la biomasa de *Nannochloropsis gaditana*. Ensayo de NP9EO.

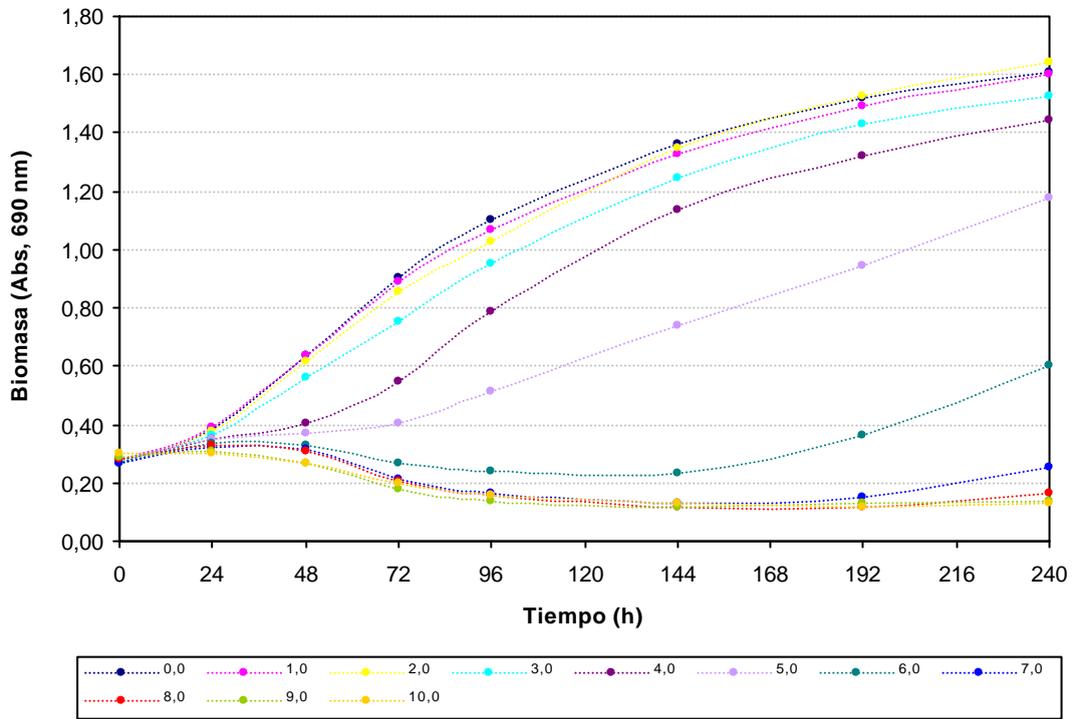
| | | <i>N. gaditana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | |
|------|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| t(d) | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| t(h) | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| 0 | | 0,276 | 0,408 | 0,687 | 0,938 | 1,138 | | | | 0,000 | 0,132 | 0,411 | 0,662 | 0,862 | | | |
| | | 0,266 | 0,376 | 0,637 | 0,892 | 1,091 | 1,363 | 1,516 | 1,610 | 0,000 | 0,110 | 0,371 | 0,626 | 0,825 | 1,097 | 1,250 | 1,344 |
| | | 0,263 | 0,356 | 0,592 | 0,880 | 1,073 | | | | 0,000 | 0,093 | 0,329 | 0,617 | 0,810 | | | |
| 1,0 | | 0,272 | 0,404 | 0,685 | 0,945 | 1,122 | | | | 0,000 | 0,132 | 0,413 | 0,673 | 0,850 | | | |
| | | 0,256 | 0,379 | 0,624 | 0,888 | 1,077 | 1,331 | 1,490 | 1,600 | 0,000 | 0,123 | 0,368 | 0,632 | 0,821 | 1,075 | 1,234 | 1,344 |
| | | 0,285 | 0,379 | 0,596 | 0,842 | 1,006 | | | | 0,000 | 0,094 | 0,311 | 0,557 | 0,721 | | | |
| 2,0 | | 0,254 | 0,388 | 0,655 | 0,898 | 1,080 | | | | 0,000 | 0,134 | 0,401 | 0,644 | 0,826 | | | |
| | | 0,279 | 0,383 | 0,625 | 0,876 | 1,052 | 1,346 | 1,525 | 1,642 | 0,000 | 0,104 | 0,346 | 0,597 | 0,773 | 1,067 | 1,246 | 1,363 |
| | | 0,281 | 0,367 | 0,564 | 0,799 | 0,957 | | | | 0,000 | 0,086 | 0,283 | 0,518 | 0,676 | | | |
| 3,0 | | 0,247 | 0,355 | 0,571 | 0,795 | 0,972 | | | | 0,000 | 0,108 | 0,324 | 0,548 | 0,725 | | | |
| | | 0,285 | 0,377 | 0,569 | 0,810 | 1,002 | 1,245 | 1,428 | 1,524 | 0,000 | 0,092 | 0,284 | 0,525 | 0,717 | 0,960 | 1,143 | 1,239 |
| | | 0,285 | 0,350 | 0,535 | 0,650 | 0,886 | | | | 0,000 | 0,065 | 0,250 | 0,365 | 0,601 | | | |
| 4,0 | | 0,282 | 0,363 | 0,425 | 0,585 | 0,840 | | | | 0,000 | 0,081 | 0,143 | 0,303 | 0,558 | | | |
| | | 0,268 | 0,332 | 0,409 | 0,581 | 0,801 | 1,139 | 1,320 | 1,443 | 0,000 | 0,064 | 0,141 | 0,313 | 0,533 | 0,871 | 1,052 | 1,175 |
| | | 0,299 | 0,345 | 0,386 | 0,468 | 0,724 | | | | 0,000 | 0,046 | 0,087 | 0,169 | 0,425 | | | |
| 5,0 | | 0,289 | 0,359 | 0,377 | 0,443 | 0,596 | | | | 0,000 | 0,070 | 0,088 | 0,154 | 0,307 | | | |
| | | 0,269 | 0,338 | 0,362 | 0,398 | 0,501 | 0,739 | 0,943 | 1,174 | 0,000 | 0,069 | 0,093 | 0,129 | 0,232 | 0,470 | 0,674 | 0,905 |
| | | 0,281 | 0,343 | 0,377 | 0,373 | 0,440 | | | | 0,000 | 0,062 | 0,096 | 0,092 | 0,159 | | | |
| 6,0 | | 0,264 | 0,337 | 0,316 | 0,270 | 0,261 | | | | 0,000 | 0,073 | 0,052 | 0,006 | -0,003 | | | |
| | | 0,285 | 0,354 | 0,339 | 0,256 | 0,224 | 0,235 | 0,364 | 0,600 | 0,000 | 0,069 | 0,054 | -0,029 | -0,061 | -0,050 | 0,079 | 0,315 |
| | | 0,259 | 0,321 | 0,339 | 0,279 | 0,239 | | | | 0,000 | 0,062 | 0,080 | 0,020 | -0,02 | | | |
| 7,0 | | 0,266 | 0,335 | 0,302 | 0,202 | 0,142 | | | | 0,000 | 0,069 | 0,036 | -0,064 | -0,124 | | | |
| | | 0,257 | 0,312 | 0,312 | 0,207 | 0,174 | 0,127 | 0,151 | 0,255 | 0,000 | 0,055 | 0,055 | -0,050 | -0,083 | -0,130 | -0,106 | -0,002 |
| | | 0,273 | 0,327 | 0,328 | 0,224 | 0,180 | | | | 0,000 | 0,054 | 0,055 | -0,049 | -0,093 | | | |
| 8,0 | | 0,289 | 0,339 | 0,295 | 0,200 | 0,148 | | | | 0,000 | 0,050 | 0,006 | -0,089 | -0,141 | | | |
| | | 0,270 | 0,307 | 0,286 | 0,196 | 0,142 | 0,116 | 0,119 | 0,167 | 0,000 | 0,037 | 0,016 | -0,074 | -0,128 | -0,154 | -0,151 | -0,103 |
| | | 0,285 | 0,333 | 0,334 | 0,226 | 0,174 | | | | 0,000 | 0,048 | 0,049 | -0,059 | -0,111 | | | |
| 9,0 | | 0,269 | 0,301 | 0,237 | 0,149 | 0,114 | | | | 0,000 | 0,032 | -0,032 | -0,120 | -0,155 | | | |
| | | 0,281 | 0,304 | 0,265 | 0,170 | 0,135 | 0,118 | 0,128 | 0,137 | 0,000 | 0,023 | -0,016 | -0,111 | -0,146 | -0,163 | -0,153 | -0,144 |
| | | 0,309 | 0,322 | 0,302 | 0,211 | 0,164 | | | | 0,000 | 0,013 | -0,007 | -0,098 | -0,145 | | | |
| 10,0 | | 0,296 | 0,291 | 0,248 | 0,180 | 0,141 | | | | 0,000 | -0,005 | -0,048 | -0,116 | -0,155 | | | |
| | | 0,299 | 0,293 | 0,272 | 0,199 | 0,155 | 0,128 | 0,119 | 0,127 | 0,000 | -0,006 | -0,027 | -0,100 | -0,144 | -0,171 | -0,180 | -0,172 |
| | | 0,310 | 0,313 | 0,288 | 0,220 | 0,178 | | | | 0,000 | 0,003 | -0,022 | -0,090 | -0,132 | | | |

Tabla A III.3.

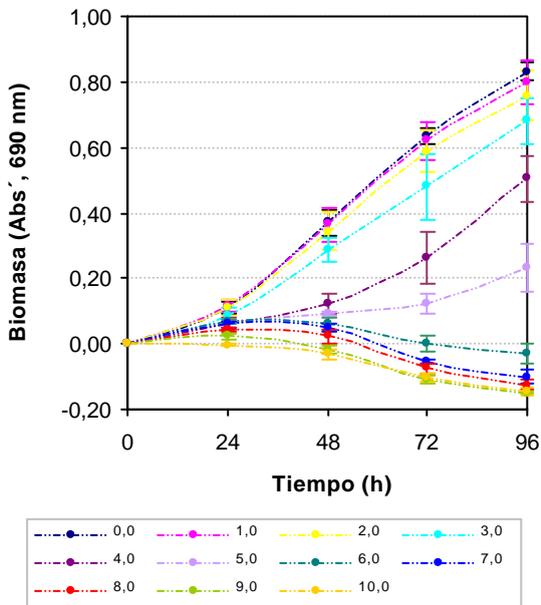
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs')

| t (h) | mg/L NP9EO | | | | | | | | | | | Promedio |
|-------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| | 0,0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 6,0 | 7,0 | 8,0 | 9,0 | 10,0 | |
| 24 | 0,112 | 0,116 | 0,108 | 0,088 | 0,064 | 0,067 | 0,068 | 0,059 | 0,045 | 0,023 | -0,003 | |
| | 0,020 | 0,020 | 0,024 | 0,022 | 0,018 | 0,004 | 0,006 | 0,008 | 0,007 | 0,010 | 0,005 | DesvEst |
| 48 | 0,370 | 0,364 | 0,343 | 0,286 | 0,124 | 0,092 | 0,062 | 0,049 | 0,024 | -0,018 | -0,032 | |
| | 0,041 | 0,051 | 0,059 | 0,037 | 0,032 | 0,004 | 0,016 | 0,011 | 0,023 | 0,013 | 0,014 | DesvEst |
| 72 | 0,635 | 0,621 | 0,586 | 0,479 | 0,262 | 0,125 | -0,001 | -0,054 | -0,074 | -0,110 | -0,102 | |
| | 0,024 | 0,059 | 0,064 | 0,100 | 0,080 | 0,031 | 0,025 | 0,008 | 0,015 | 0,011 | 0,013 | DesvEst |
| 96 | 0,832 | 0,797 | 0,758 | 0,681 | 0,505 | 0,233 | -0,028 | -0,100 | -0,127 | -0,149 | -0,144 | |
| | 0,027 | 0,068 | 0,076 | 0,069 | 0,071 | 0,074 | 0,030 | 0,021 | 0,015 | 0,006 | 0,012 | DesvEst |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

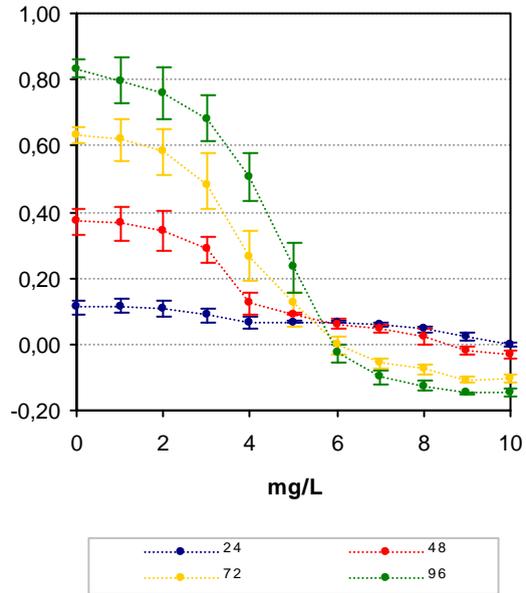


Tabla A III.4.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *N. gaditana* expuesta a diferentes concentraciones de NP9EO.

| <i>N. gaditana</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas (**) | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,965 | | 0,969 | | 0,956 | | 0,957 | |
| B calculado | 11,78 | | 15,49 | | 13,60 | | 11,19 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L NP9EO | t _i | p |
| 1,0 | -0,38 | 0,39310 | 0,24 | 0,43759 | 0,49 | 0,35780 | 0,70 | 0,22455 |
| 2,0 | 0,30 | 0,42420 | 1,03 | 0,27541 | 1,68 | 0,14138 | 1,48 | 0,09509 |
| 3,0 | 1,92 | 0,11951 | 3,21 (*) | 0,02869 | 4,39 (*) | 0,00875 | 3,06 (*) | 0,01372 |
| 4,0 | 3,96 (*) | 0,01696 | 9,38 | 0,00059 | 11,89 | 0,00005 | 6,97 | 0,00118 |
| 5,0 | 3,68 | 0,00906 | 10,58 | 0,00015 | 17,59 | 0,00001 | 14,05 | 0,00019 |
| 6,0 | 3,60 | 0,01024 | 11,73 | 0,00013 | 21,94 | 0,00000 | 22,41 | 0,00000 |
| 7,0 | 4,31 | 0,00652 | 12,24 | 0,00010 | 23,78 | 0,00000 | 25,13 | 0,00000 |
| 8,0 | 5,50 | 0,00256 | 13,19 | 0,00011 | 24,45 | 0,00000 | 26,19 | 0,00000 |
| 9,0 | 7,34 | 0,00104 | 14,79 | 0,00005 | 25,69 | 0,00000 | 27,09 | 0,00000 |
| 10,0 | 9,43 | 0,00030 | 15,32 | 0,00004 | 25,42 | 0,00000 | 26,88 | 0,00000 |
| MSD | 0,032 | | 0,069 | | 0,077 | | 0,032 | |
| % reducción | 28,67 | | 18,74 | | 12,05 | | 12,34 | |
| <p><i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64</p> <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> <p>** Análisis estadístico realizado a partir de los datos transformados logarítmicamente ($\log(x+1)$).</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,919 | | 0,934 | | 0,955 | | 0,959 | | 0,958 | | 0,956 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 4,14 | | 5,80 | | 7,12 | | 9,01 | | 11,63 | | 13,60 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L NP9EO | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 1,0 | 0,27 | 0,36 | 0,29 | 0,36 | 0,43 | 0,36 | 0,45 | 0,36 | 0,47 | 0,36 | 0,49 | 0,36 |
| 2,0 | 0,92 | 0,14 | 0,98 | 0,14 | 1,46 | 0,14 | 1,53 | 0,14 | 1,61 | 0,14 | 1,68 | 0,14 |
| 3,0 | 2,93(*) | 0,03 | 3,12(*) | 0,03 | 3,82(*) | 0,01 | 4,02(*) | 0,01 | 4,21(*) | 0,01 | 4,39(*) | 0,01 |
| 4,0 | 7,02 | 0,00 | 7,49 | 0,00 | 10,33 | 0,00 | 10,87 | 0,00 | 11,41 | 0,00 | 11,89 | 0,00 |
| 5,0 | 9,59 | 0,00 | 10,23 | 0,00 | 15,29 | 0,00 | 16,08 | 0,00 | 16,88 | 0,00 | 17,59 | 0,00 |
| 6,0 | --- | --- | 12,76 | 0,00 | 19,07 | 0,00 | 20,06 | 0,00 | 21,05 | 0,00 | 21,94 | 0,00 |
| 7,0 | --- | --- | --- | --- | 20,67 | 0,00 | 21,74 | 0,00 | 22,81 | 0,00 | 23,78 | 0,00 |
| 8,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 22,36 | 0,00 | 23,46 | 0,00 | 24,45 | 0,00 |
| 9,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 24,64 | 0,00 | 25,69 | 0,00 |
| 10,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 25,42 | 0,00 |
| MSD | 0,133 | | 0,126 | | 0,085 | | 0,082 | | 0,079 | | 0,077 | |
| % reducción | 20,94 | | 19,86 | | 13,45 | | 12,88 | | 12,37 | | 12,05 | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | | | | | |

Tabla A III.5.
Valores de ICp del ensayo de *N. gaditana* y NP9EO a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de NP9EO estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expan. Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 1,5073 | -0,6129 | 0,4977 | 1,4333 | 2,2304 | 3,0258 | 0,5248 |
| | 25 | 3,0142 | 1,8485 | 2,4591 | 2,9635 | 3,2890 | 3,5914 | 0,2429 |
| | 50 | 3,7435 | 3,1085 | 3,4411 | 3,7367 | 3,9848 | 4,2503 | 0,1557 |
| | 75 | 4,7530 | 3,7033 | 4,2532 | 4,7301 | 4,9450 | 5,1562 | 0,1475 |
| | 95 | 5,7460 | 5,6137 | 5,6830 | 5,7693 | 5,8766 | 6,0203 | 0,0510 |
| 96 | 5 | 1,1697 | -0,3307 | 0,4552 | 1,2495 | 2,2229 | 3,3814 | 0,5370 |
| | 25 | 3,3231 | 2,3608 | 2,8648 | 3,3067 | 3,5902 | 3,8841 | 0,1775 |
| | 50 | 4,3270 | 3,7640 | 4,0589 | 4,3136 | 4,4869 | 4,6627 | 0,1018 |
| | 75 | 5,1057 | 4,5932 | 4,8616 | 5,0953 | 5,3222 | 5,5604 | 0,1224 |
| | 95 | 5,8211 | 5,6519 | 5,7406 | 5,8166 | 5,8636 | 5,9104 | 0,0298 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

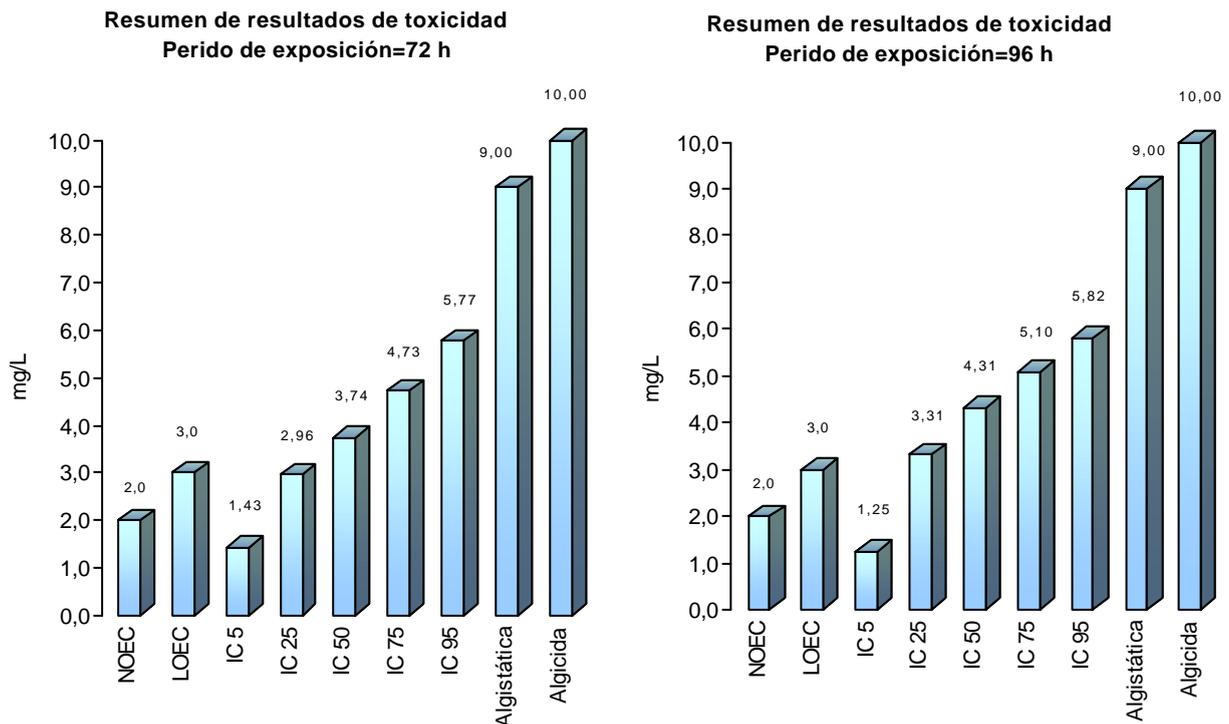
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de NP9EO ensayadas con *N. gaditana* (7, 8, 9 y 10 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa en el vial correspondiente a 7 mg/L, un ligero aumento en los viales de 8 y 9 mg/L, y no se observó ningún cambio apreciable en la concentración de 10 mg/L.

- Concentración alguistática= 9 mg/L
- Concentración alguicida= 10 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del NP9EO y *N. gaditana*.



2.2. *Isochrysis galbana*

Tabla A III.6.

Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de NP9EO.

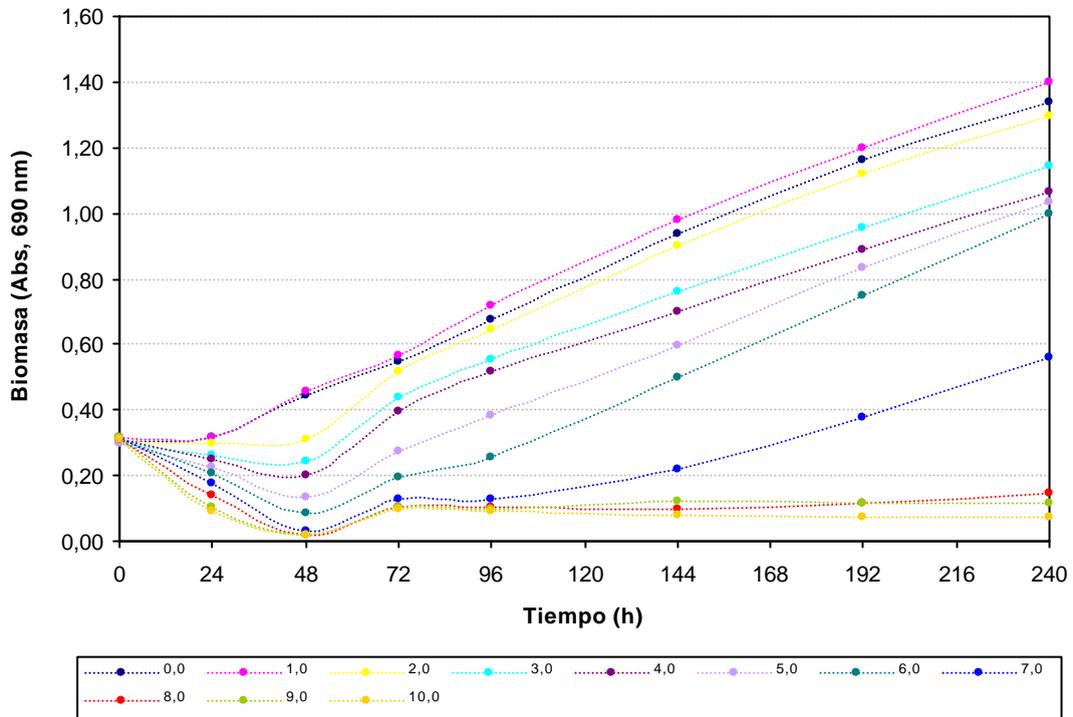
| <i>I. galbana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | Abs´ = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| 0,0 | 0,284 | 0,307 | 0,435 | 0,537 | 0,644 | | | | 0,000 | 0,023 | 0,151 | 0,253 | 0,360 | | | | |
| | 0,307 | 0,321 | 0,449 | 0,559 | 0,706 | 0,937 | 1,159 | 1,341 | 0,000 | 0,014 | 0,142 | 0,252 | 0,399 | 0,630 | 0,852 | 1,034 | |
| | 0,322 | 0,324 | 0,441 | 0,554 | 0,684 | | | | 0,000 | 0,002 | 0,119 | 0,232 | 0,362 | | | | |
| 1,0 | 0,319 | 0,328 | 0,468 | 0,577 | 0,723 | | | | 0,000 | 0,009 | 0,149 | 0,258 | 0,404 | | | | |
| | 0,313 | 0,313 | 0,450 | 0,571 | 0,723 | 0,977 | 1,196 | 1,399 | 0,000 | 0,000 | 0,137 | 0,258 | 0,410 | 0,664 | 0,883 | 1,086 | |
| | 0,326 | 0,316 | 0,446 | 0,557 | 0,700 | | | | 0,000 | -0,010 | 0,120 | 0,231 | 0,374 | | | | |
| 2,0 | 0,311 | 0,307 | 0,331 | 0,537 | 0,667 | | | | 0,000 | -0,004 | 0,020 | 0,226 | 0,356 | | | | |
| | 0,308 | 0,294 | 0,313 | 0,522 | 0,669 | 0,900 | 1,122 | 1,296 | 0,000 | -0,014 | 0,005 | 0,214 | 0,361 | 0,592 | 0,814 | 0,988 | |
| | 0,294 | 0,294 | 0,289 | 0,484 | 0,600 | | | | 0,000 | 0,000 | -0,005 | 0,190 | 0,306 | | | | |
| 3,0 | 0,325 | 0,282 | 0,270 | 0,476 | 0,600 | | | | 0,000 | -0,043 | -0,055 | 0,151 | 0,275 | | | | |
| | 0,283 | 0,244 | 0,223 | 0,418 | 0,536 | 0,759 | 0,956 | 1,144 | 0,000 | -0,039 | -0,060 | 0,135 | 0,253 | 0,476 | 0,673 | 0,861 | |
| | 0,294 | 0,257 | 0,232 | 0,426 | 0,529 | | | | 0,000 | -0,037 | -0,062 | 0,132 | 0,235 | | | | |
| 4,0 | 0,304 | 0,247 | 0,203 | 0,403 | 0,538 | | | | 0,000 | -0,057 | -0,101 | 0,099 | 0,234 | | | | |
| | 0,303 | 0,235 | 0,207 | 0,397 | 0,535 | 0,702 | 0,891 | 1,064 | 0,000 | -0,068 | -0,096 | 0,094 | 0,232 | 0,399 | 0,588 | 0,761 | |
| | 0,319 | 0,259 | 0,198 | 0,378 | 0,476 | | | | 0,000 | -0,060 | -0,121 | 0,059 | 0,157 | | | | |
| 5,0 | 0,301 | 0,233 | 0,138 | 0,300 | 0,428 | | | | 0,000 | -0,068 | -0,163 | -0,001 | 0,127 | | | | |
| | 0,298 | 0,225 | 0,124 | 0,258 | 0,363 | 0,594 | 0,836 | 1,033 | 0,000 | -0,073 | -0,174 | -0,040 | 0,065 | 0,296 | 0,538 | 0,735 | |
| | 0,293 | 0,225 | 0,136 | 0,261 | 0,352 | | | | 0,000 | -0,068 | -0,157 | -0,032 | 0,059 | | | | |
| 6,0 | 0,294 | 0,195 | 0,079 | 0,187 | 0,278 | | | | 0,000 | -0,099 | -0,215 | -0,107 | -0,016 | | | | |
| | 0,315 | 0,218 | 0,101 | 0,207 | 0,265 | 0,499 | 0,747 | 0,998 | 0,000 | -0,097 | -0,214 | -0,108 | -0,050 | 0,184 | 0,432 | 0,683 | |
| | 0,314 | 0,202 | 0,080 | 0,199 | 0,228 | | | | 0,000 | -0,112 | -0,234 | -0,115 | -0,086 | | | | |
| 7,0 | 0,318 | 0,170 | 0,023 | 0,126 | 0,128 | | | | 0,000 | -0,148 | -0,295 | -0,192 | -0,190 | | | | |
| | 0,314 | 0,179 | 0,034 | 0,130 | 0,128 | 0,221 | 0,377 | 0,558 | 0,000 | -0,135 | -0,280 | -0,184 | -0,186 | -0,093 | 0,063 | 0,244 | |
| | 0,317 | 0,181 | 0,032 | 0,134 | 0,132 | | | | 0,000 | -0,136 | -0,285 | -0,183 | -0,185 | | | | |
| 8,0 | 0,307 | 0,128 | 0,010 | 0,103 | 0,090 | | | | 0,000 | -0,179 | -0,297 | -0,204 | -0,217 | | | | |
| | 0,299 | 0,122 | 0,014 | 0,085 | 0,089 | 0,096 | 0,114 | 0,145 | 0,000 | -0,177 | -0,285 | -0,214 | -0,210 | -0,203 | -0,185 | -0,154 | |
| | 0,328 | 0,165 | 0,028 | 0,123 | 0,128 | | | | 0,000 | -0,163 | -0,300 | -0,205 | -0,200 | | | | |
| 9,0 | 0,329 | 0,112 | 0,020 | 0,117 | 0,108 | | | | 0,000 | -0,217 | -0,309 | -0,212 | -0,221 | | | | |
| | 0,324 | 0,117 | 0,010 | 0,120 | 0,112 | 0,124 | 0,113 | 0,118 | 0,000 | -0,207 | -0,314 | -0,204 | -0,212 | -0,200 | -0,211 | -0,206 | |
| | 0,297 | 0,078 | 0,025 | 0,079 | 0,079 | | | | 0,000 | -0,219 | -0,272 | -0,218 | -0,218 | | | | |
| 10,0 | 0,304 | 0,089 | 0,026 | 0,096 | 0,086 | | | | 0,000 | -0,215 | -0,278 | -0,208 | -0,218 | | | | |
| | 0,297 | 0,073 | 0,027 | 0,081 | 0,079 | 0,077 | 0,070 | 0,071 | 0,000 | -0,224 | -0,270 | -0,216 | -0,218 | -0,220 | -0,227 | -0,226 | |
| | 0,324 | 0,116 | 0,010 | 0,110 | 0,108 | | | | 0,000 | -0,208 | -0,314 | -0,214 | -0,216 | | | | |

Tabla A III.7.

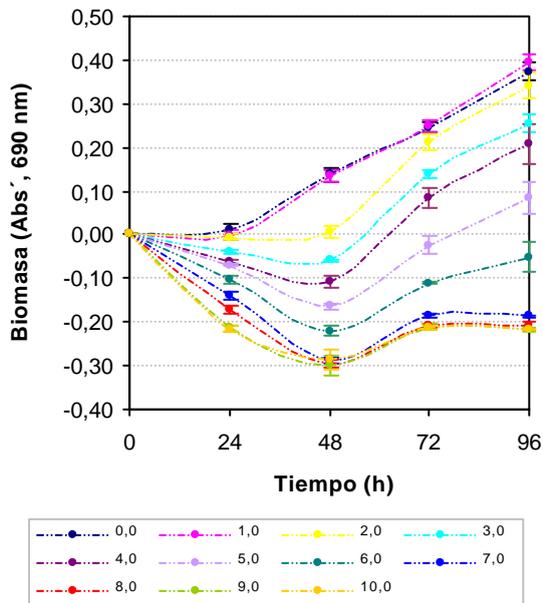
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs´)

| t (h) | mg/L NP9EO | | | | | | | | | | | Promedio |
|-------|------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| | 0,0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 6,0 | 7,0 | 8,0 | 9,0 | 10,0 | |
| 24 | 0,013 | 0,000 | -0,006 | -0,040 | -0,062 | -0,070 | -0,103 | -0,140 | -0,173 | -0,214 | -0,216 | DesvEst |
| | 0,011 | 0,010 | 0,007 | 0,003 | 0,006 | 0,003 | 0,008 | 0,007 | 0,009 | 0,006 | 0,008 | |
| 48 | 0,137 | 0,135 | 0,007 | -0,059 | -0,106 | -0,165 | -0,221 | -0,287 | -0,294 | -0,298 | -0,287 | DesvEst |
| | 0,017 | 0,015 | 0,013 | 0,004 | 0,013 | 0,009 | 0,011 | 0,008 | 0,008 | 0,023 | 0,023 | |
| 72 | 0,246 | 0,249 | 0,210 | 0,139 | 0,084 | -0,024 | -0,110 | -0,186 | -0,208 | -0,211 | -0,213 | DesvEst |
| | 0,012 | 0,016 | 0,018 | 0,010 | 0,022 | 0,021 | 0,004 | 0,005 | 0,006 | 0,007 | 0,004 | |
| 96 | 0,374 | 0,396 | 0,341 | 0,254 | 0,208 | 0,084 | -0,051 | -0,187 | -0,209 | -0,217 | -0,217 | DesvEst |
| | 0,022 | 0,019 | 0,030 | 0,020 | 0,044 | 0,038 | 0,035 | 0,003 | 0,009 | 0,005 | 0,001 | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

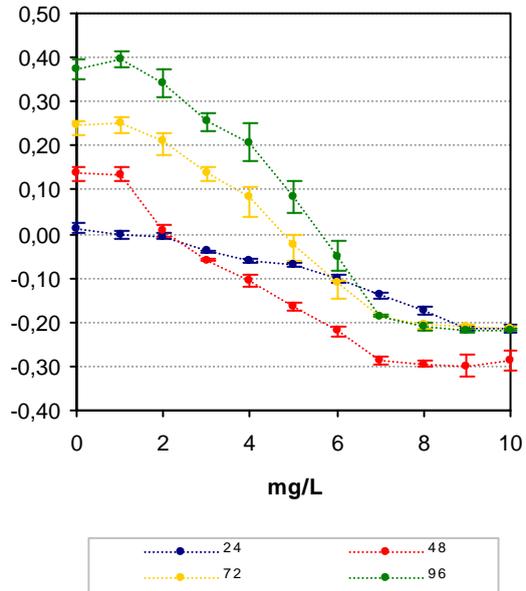


Tabla A III.8.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *I. galbana* expuesta a diferentes concentraciones de NP9EO.

| <i>I. galbana</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas (**) | |
|--|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,950 | | 0,989 | | 0,981 | | 0,978 | |
| B calculado | 4,76 | | 9,37 | | 11,91 | | 20,98 (⊗) | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L NP9EO | t _i | p |
| 1,0 | 2,20 | 0,08947 | -0,42 | 0,33533 | -0,31 | 0,39138 | -0,90 | 0,12790 |
| 2,0 | 3,14 (*) | 0,03074 | 11,71 (*) | 0,00020 | 3,36 (*) | 0,02366 | 1,35 | 0,10357 |
| 3,0 | 8,71 | 0,00057 | 17,59 | 0,00002 | 10,01 | 0,00015 | 5,08 (*) | 0,00111 |
| 4,0 | 12,34 | 0,00021 | 21,80 | 0,00002 | 15,21 | 0,00018 | 7,22 | 0,00252 |
| 5,0 | 13,67 | 0,00010 | 27,05 | 0,00000 | 25,41 | 0,00002 | 13,27 | 0,00021 |
| 6,0 | 19,12 | 0,00006 | 32,10 | 0,00000 | 33,47 | 0,00000 | 20,67 | 0,00005 |
| 7,0 | 25,24 | 0,00002 | 37,98 | 0,00000 | 40,65 | 0,00000 | 29,31 | 0,00000 |
| 8,0 | 30,75 | 0,00001 | 38,64 | 0,00000 | 42,66 | 0,00000 | 30,85 | 0,00000 |
| 9,0 | 37,58 | 0,00000 | 39,03 | 0,00001 | 43,00 | 0,00000 | 31,41 | 0,00000 |
| 10,0 | 37,80 | 0,00000 | 38,04 | 0,00001 | 43,13 | 0,00000 | 31,44 | 0,00000 |
| MSD | 0,016 | | 0,029 | | 0,028 | | 0,021 | |
| % reducción | 122,83 | | 21,46 | | 11,42 | | 14,88 | |
| <p><i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64</p> <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola).</p> <p>(⊗) Estadístico calculado mayor que el valor crítico (No distribución normal o No homogeneidad de la varianza)</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,944 | | 0,967 | | 0,955 | | 0,958 | | 0,965 | | 0,981 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 1,42 | | 4,30 | | 7,32 | | 8,86 | | 9,49 | | 11,91 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L NP9EO | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 1,0 | -0,24 | 0,39 | -0,26 | 0,39 | -0,34 | 0,39 | -0,36 | 0,39 | -0,37 | 0,39 | -0,31 | 0,39 |
| 2,0 | 2,58(*) | 0,02 | 2,77(*) | 0,02 | 0,27 | 0,42 | 0,28 | 0,42 | 0,29 | 0,42 | 3,36(*) | 0,02 |
| 3,0 | 7,69 | 0,00 | 8,26 | 0,00 | 1,70 | 0,12 | 1,78 | 0,12 | 1,84 | 0,12 | 10,01 | 0,00 |
| 4,0 | 11,68 | 0,00 | 12,55 | 0,00 | 3,49(*) | 0,02 | 3,67(*) | 0,02 | 3,79(*) | 0,02 | 15,21 | 0,00 |
| 5,0 | 19,51 | 0,00 | 20,96 | 0,00 | 3,25 | 0,01 | 3,41 | 0,01 | 3,53 | 0,01 | 25,41 | 0,00 |
| 6,0 | --- | --- | 27,61 | 0,00 | 3,18 | 0,01 | 3,34 | 0,01 | 3,45 | 0,01 | 33,47 | 0,00 |
| 7,0 | --- | --- | --- | --- | 3,81 | 0,01 | 4,00 | 0,01 | 4,13 | 0,01 | 40,65 | 0,00 |
| 8,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 5,09 | 0,00 | 5,27 | 0,00 | 42,66 | 0,00 |
| 9,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 7,03 | 0,00 | 43,00 | 0,00 |
| 10,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 43,13 | 0,00 |
| MSD | 0,039 | | 0,037 | | 0,035 | | 0,034 | | 0,033 | | 0,028 | |
| % reducción | 34,70 | | 32,75 | | 31,49 | | 30,24 | | 29,47 | | 11,42 | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | | | | | |

Tabla A III.9.
Valores de ICp del ensayo de *I. galbana* y NP9EO a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de NP9EO estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expan. Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 1,3313 | 0,3328 | 0,8558 | 1,2859 | 1,5797 | 1,8530 | 0,1642 |
| | 25 | 2,3467 | 1,8213 | 2,0965 | 2,3201 | 2,4878 | 2,6430 | 0,1019 |
| | 50 | 3,2831 | 2,9422 | 3,1255 | 3,2755 | 3,4690 | 3,6734 | 0,0922 |
| | 75 | 4,2639 | 3,6452 | 3,9693 | 4,2454 | 4,3754 | 4,4981 | 0,1001 |
| | 95 | 4,8528 | 4,7247 | 4,7918 | 4,8498 | 4,8749 | 4,8993 | 0,0198 |
| 96 | 5 | 1,4390 | 0,9829 | 1,2218 | 1,4907 | 2,0290 | 2,6781 | 0,2119 |
| | 25 | 2,6043 | 2,0198 | 2,3260 | 2,5978 | 2,8296 | 3,0775 | 0,1242 |
| | 50 | 4,1230 | 3,1725 | 3,6704 | 4,0820 | 4,3403 | 4,5793 | 0,1807 |
| | 75 | 4,8989 | 4,4943 | 4,7062 | 4,9070 | 5,2425 | 5,6204 | 0,1389 |
| | 95 | 5,7700 | 5,5675 | 5,6736 | 5,7602 | 5,8469 | 5,9315 | 0,0500 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

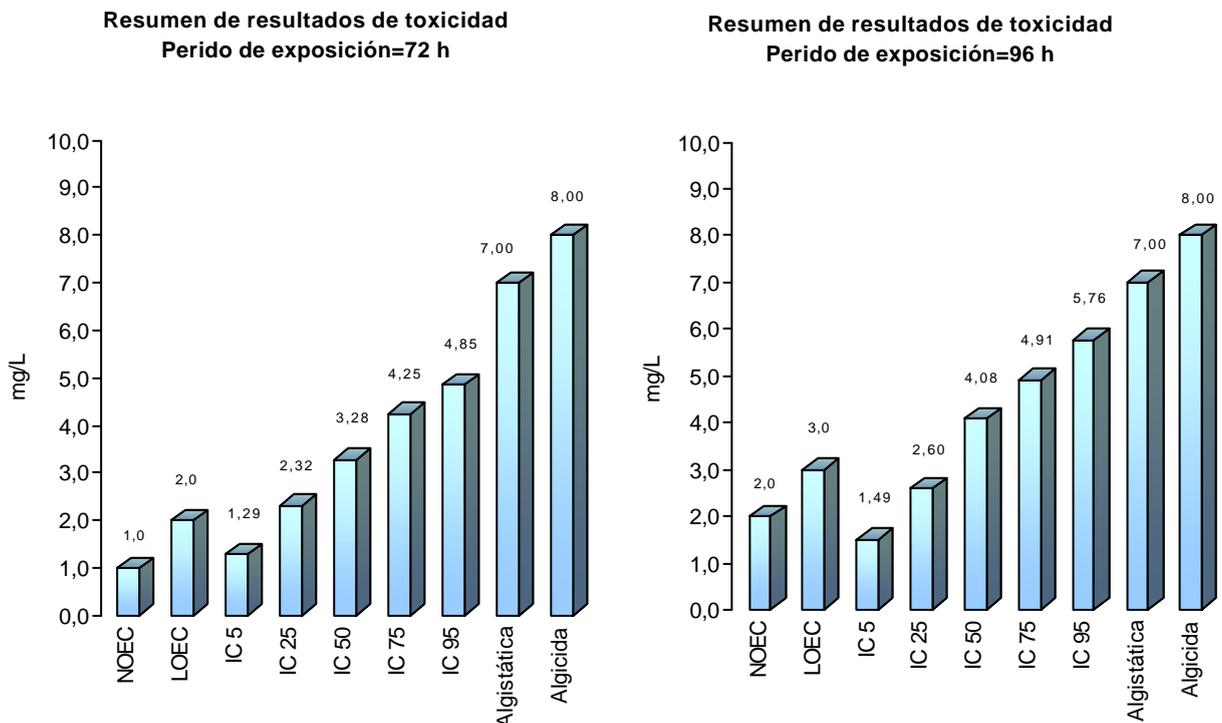
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de NP9EO ensayadas con *I. galbana* (7, 8, 9 y 10 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento ligero de la biomasa en el vial correspondiente a 7 mg/L, y no se observó ningún cambio apreciable en las concentraciones de 8, 9 y 10 mg/L.

- Concentración alguistática= 7 mg/L
- Concentración alguicida= 8 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del NP9EO y *I. galbana*.



2.3. Dunaliella salina

Tabla A III.10.

Evolución de la biomasa de Dunaliella salina. Ensayo de NP9EO.

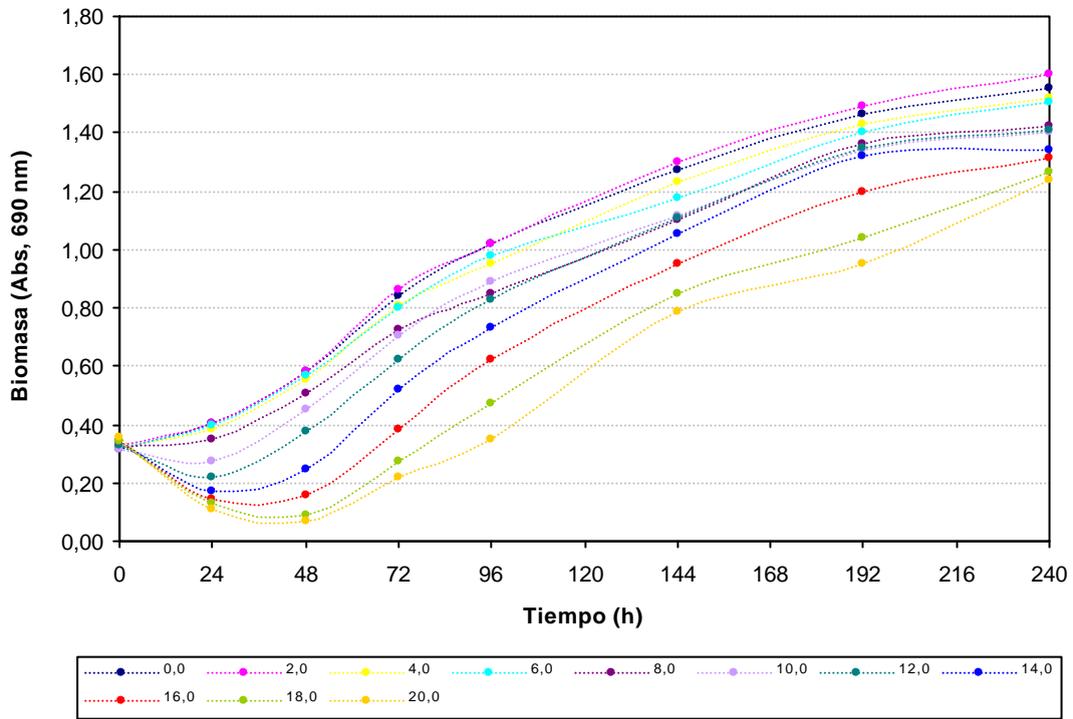
| | | D. salina. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | |
|------|--|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|
| t(d) | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| t(h) | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| 0,0 | | 0,347 | 0,437 | 0,681 | 0,969 | 1,172 | | | | 0,000 | 0,090 | 0,334 | 0,622 | 0,825 | | | |
| | | 0,295 | 0,393 | 0,543 | 0,820 | 0,980 | 1,273 | 1,464 | 1,552 | 0,000 | 0,098 | 0,248 | 0,525 | 0,685 | 0,978 | 1,169 | 1,257 |
| | | 0,294 | 0,373 | 0,511 | 0,741 | 0,909 | | | | 0,000 | 0,079 | 0,217 | 0,447 | 0,615 | | | |
| 2,0 | | 0,350 | 0,448 | 0,693 | 0,979 | 1,189 | | | | 0,000 | 0,098 | 0,343 | 0,629 | 0,839 | | | |
| | | 0,330 | 0,398 | 0,592 | 0,881 | 1,083 | 1,300 | 1,493 | 1,603 | 0,000 | 0,068 | 0,262 | 0,551 | 0,753 | 0,970 | 1,163 | 1,273 |
| | | 0,303 | 0,372 | 0,467 | 0,728 | 0,792 | | | | 0,000 | 0,069 | 0,164 | 0,425 | 0,489 | | | |
| 4,0 | | 0,318 | 0,401 | 0,620 | 0,918 | 1,083 | | | | 0,000 | 0,083 | 0,302 | 0,600 | 0,765 | | | |
| | | 0,319 | 0,379 | 0,575 | 0,792 | 0,988 | 1,232 | 1,428 | 1,521 | 0,000 | 0,060 | 0,256 | 0,473 | 0,669 | 0,913 | 1,109 | 1,202 |
| | | 0,324 | 0,367 | 0,478 | 0,714 | 0,788 | | | | 0,000 | 0,043 | 0,154 | 0,390 | 0,464 | | | |
| 6,0 | | 0,346 | 0,442 | 0,668 | 0,937 | 1,151 | | | | 0,000 | 0,096 | 0,322 | 0,591 | 0,805 | | | |
| | | 0,302 | 0,386 | 0,537 | 0,775 | 0,955 | 1,178 | 1,405 | 1,503 | 0,000 | 0,084 | 0,235 | 0,473 | 0,653 | 0,876 | 1,103 | 1,201 |
| | | 0,321 | 0,366 | 0,494 | 0,685 | 0,827 | | | | 0,000 | 0,045 | 0,173 | 0,364 | 0,506 | | | |
| 8,0 | | 0,320 | 0,383 | 0,571 | 0,845 | 0,980 | | | | 0,000 | 0,063 | 0,251 | 0,525 | 0,660 | | | |
| | | 0,326 | 0,345 | 0,533 | 0,726 | 0,896 | 1,103 | 1,365 | 1,423 | 0,000 | 0,019 | 0,207 | 0,400 | 0,570 | 0,777 | 1,039 | 1,097 |
| | | 0,312 | 0,329 | 0,415 | 0,611 | 0,666 | | | | 0,000 | 0,017 | 0,103 | 0,299 | 0,354 | | | |
| 10,0 | | 0,321 | 0,313 | 0,560 | 0,839 | 1,073 | | | | 0,000 | -0,008 | 0,239 | 0,518 | 0,752 | | | |
| | | 0,316 | 0,294 | 0,452 | 0,698 | 0,891 | 1,113 | 1,344 | 1,400 | 0,000 | -0,022 | 0,136 | 0,382 | 0,575 | 0,797 | 1,028 | 1,084 |
| | | 0,313 | 0,222 | 0,343 | 0,571 | 0,707 | | | | 0,000 | -0,091 | 0,030 | 0,258 | 0,394 | | | |
| 12,0 | | 0,298 | 0,205 | 0,423 | 0,637 | 0,857 | | | | 0,000 | -0,093 | 0,125 | 0,339 | 0,559 | | | |
| | | 0,341 | 0,225 | 0,392 | 0,699 | 0,926 | 1,107 | 1,350 | 1,410 | 0,000 | -0,116 | 0,051 | 0,358 | 0,585 | 0,766 | 1,009 | 1,069 |
| | | 0,341 | 0,218 | 0,317 | 0,536 | 0,698 | | | | 0,000 | -0,123 | -0,024 | 0,195 | 0,357 | | | |
| 14,0 | | 0,349 | 0,183 | 0,282 | 0,594 | 0,836 | | | | 0,000 | -0,166 | -0,067 | 0,245 | 0,487 | | | |
| | | 0,353 | 0,181 | 0,257 | 0,545 | 0,768 | 1,057 | 1,321 | 1,344 | 0,000 | -0,172 | -0,096 | 0,192 | 0,415 | 0,704 | 0,968 | 0,991 |
| | | 0,328 | 0,147 | 0,190 | 0,422 | 0,603 | | | | 0,000 | -0,181 | -0,138 | 0,094 | 0,275 | | | |
| 16,0 | | 0,317 | 0,129 | 0,177 | 0,490 | 0,723 | | | | 0,000 | -0,188 | -0,140 | 0,173 | 0,406 | | | |
| | | 0,345 | 0,146 | 0,156 | 0,364 | 0,636 | 0,951 | 1,200 | 1,315 | 0,000 | -0,199 | -0,189 | 0,019 | 0,291 | 0,606 | 0,855 | 0,970 |
| | | 0,358 | 0,163 | 0,139 | 0,288 | 0,513 | | | | 0,000 | -0,195 | -0,219 | -0,070 | 0,155 | | | |
| 18,0 | | 0,346 | 0,128 | 0,136 | 0,369 | 0,635 | | | | 0,000 | -0,218 | -0,210 | 0,023 | 0,289 | | | |
| | | 0,329 | 0,117 | 0,074 | 0,252 | 0,483 | 0,852 | 1,038 | 1,263 | 0,000 | -0,212 | -0,255 | -0,077 | 0,154 | 0,523 | 0,709 | 0,934 |
| | | 0,356 | 0,145 | 0,063 | 0,195 | 0,304 | | | | 0,000 | -0,211 | -0,293 | -0,161 | -0,052 | | | |
| 20,0 | | 0,364 | 0,133 | 0,094 | 0,233 | 0,418 | | | | 0,000 | -0,231 | -0,270 | -0,131 | 0,054 | | | |
| | | 0,374 | 0,120 | 0,082 | 0,210 | 0,424 | 0,789 | 0,954 | 1,241 | 0,000 | -0,254 | -0,292 | -0,164 | 0,050 | 0,415 | 0,580 | 0,867 |
| | | 0,338 | 0,082 | 0,025 | 0,213 | 0,213 | | | | 0,000 | -0,256 | -0,313 | -0,125 | -0,125 | | | |

Tabla A III.11.

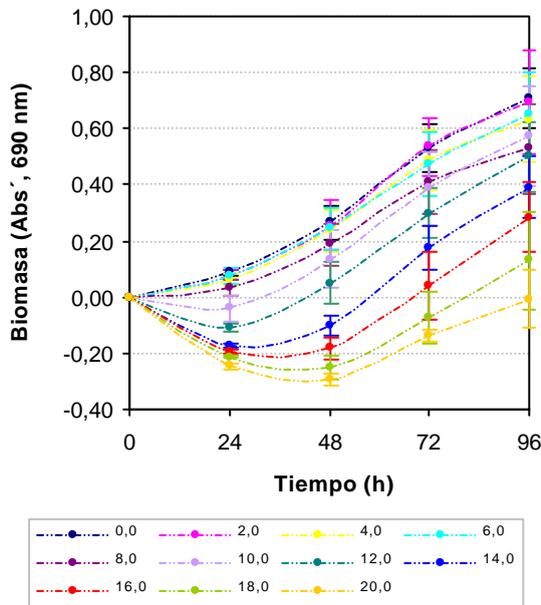
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs')

| t (h) | mg/L NP9EO | | | | | | | | | | | Promedio | DesvEst |
|-------|------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|---------|
| | 0,0 | 2,0 | 4,0 | 6,0 | 8,0 | 10,0 | 12,0 | 14,0 | 16,0 | 18,0 | 20,0 | | |
| 24 | 0,089 | 0,078 | 0,062 | 0,075 | 0,033 | -0,040 | -0,111 | -0,173 | -0,194 | -0,214 | -0,247 | Promedio | DesvEst |
| | 0,010 | 0,017 | 0,020 | 0,027 | 0,026 | 0,044 | 0,016 | 0,008 | 0,006 | 0,004 | 0,014 | | |
| 48 | 0,266 | 0,256 | 0,237 | 0,243 | 0,187 | 0,135 | 0,051 | -0,100 | -0,183 | -0,253 | -0,292 | Promedio | DesvEst |
| | 0,061 | 0,090 | 0,076 | 0,075 | 0,076 | 0,105 | 0,075 | 0,036 | 0,040 | 0,042 | 0,022 | | |
| 72 | 0,531 | 0,535 | 0,488 | 0,476 | 0,408 | 0,386 | 0,297 | 0,177 | 0,041 | -0,072 | -0,140 | Promedio | DesvEst |
| | 0,088 | 0,103 | 0,106 | 0,114 | 0,113 | 0,130 | 0,089 | 0,077 | 0,123 | 0,092 | 0,021 | | |
| 96 | 0,708 | 0,694 | 0,633 | 0,655 | 0,528 | 0,574 | 0,500 | 0,392 | 0,284 | 0,130 | -0,007 | Promedio | DesvEst |
| | 0,107 | 0,182 | 0,154 | 0,150 | 0,157 | 0,179 | 0,125 | 0,108 | 0,126 | 0,172 | 0,102 | | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

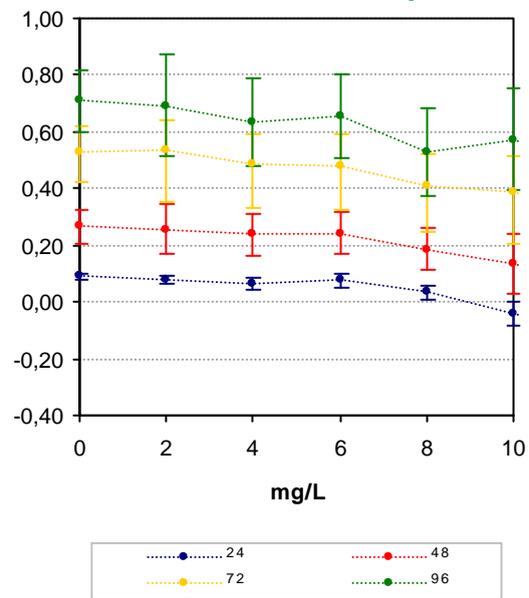


Tabla A III.12.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *D. salina* expuesta a diferentes concentraciones de NP9EO.

| <i>D. salina</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas (**) | | 96 horas (**) | |
|--|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,964 | | 0,968 | | 0,951 | | 0,935 | |
| B calculado | 14,96 | | 5,99 | | 3,98 | | 2,06 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L NP9EO | t _i | p |
| 2,0 | 0,63 | 0,19883 | 0,18 | 0,44029 | -0,03 | 0,48561 | -0,09 | 0,45261 |
| 4,0 | 1,60 | 0,05159 | 0,52 | 0,31597 | 0,46 | 0,30198 | 0,34 | 0,33391 |
| 6,0 | 0,83 | 0,22006 | 0,42 | 0,35019 | 0,59 | 0,26665 | 0,41 | 0,31328 |
| 8,0 | 3,32 (*) | 0,01242 | 1,44 | 0,11520 | 1,33 | 0,10464 | 1,03 | 0,15697 |
| 10,0 | 7,67 | 0,00394 | 2,38 | 0,06642 | 1,59 | 0,09243 | 1,13 | 0,13466 |
| 12,0 | 11,85 | 0,00002 | 3,90 (*) | 0,00885 | 2,60 | 0,01668 | 1,63 | 0,04901 |
| 14,0 | 15,54 | 0,00000 | 6,64 | 0,00042 | 4,12 (*) | 0,00318 | 2,55 | 0,01187 |
| 16,0 | 16,79 | 0,00000 | 8,13 | 0,00021 | 6,10 | 0,00329 | 3,57 (*) | 0,00646 |
| 18,0 | 17,96 | 0,00000 | 9,40 | 0,00013 | 7,87 | 0,00080 | 5,22 | 0,00613 |
| 20,0 | 19,94 | 0,00000 | 10,10 | 0,00006 | 9,01 | 0,00004 | 6,77 | 0,00078 |
| MSD | 0,044 | | 0,146 | | 0,073 | | 0,092 | |
| % reducción | 50,00 | | 54,76 | | 39,69 | | 39,76 | |
| <p>W crítica (N=33 y α=0,05)= 0,931; B crítica (V=No conc.-1, y α=0,05)=18,31; T crítica (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64</p> <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un a= 0,05 en la prueba de Dunnett (1-cola).</p> <p>** Análisis estadístico realizado a partir de los datos transformados logarítmicamente (log(x+1)).</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|---|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|
| t=72 h | n=18 (**) | | n=21 (**) | | n=24 (**) | | n=27 (**) | | n=30 (**) | | n=33 (**) | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,910 | | 0,917 | | 0,913 (⊗) | | 0,945 | | 0,940 | | 0,951 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 0,47 | | 0,48 | | 0,53 | | 1,35 | | 1,52 | | 3,98 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L NP9EO | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 2,0 | -0,03 | 0,49 | -0,03 | 0,49 | -0,03 | 0,49 | -0,03 | 0,49 | -0,03 | 0,49 | -0,03 | 0,49 |
| 4,0 | 0,48 | 0,30 | 0,48 | 0,30 | 0,49 | 0,30 | 0,45 | 0,30 | 0,44 | 0,30 | 0,46 | 0,30 |
| 6,0 | 0,61 | 0,27 | 0,62 | 0,27 | 0,63 | 0,27 | 0,58 | 0,27 | 0,56 | 0,27 | 0,59 | 0,27 |
| 8,0 | 1,38 | 0,10 | 1,40 | 0,10 | 1,42 | 0,10 | 1,31 | 0,10 | 1,27 | 0,10 | 1,33 | 0,10 |
| 10,0 | 1,65 | 0,09 | 1,67 | 0,09 | 1,69 | 0,09 | 1,56 | 0,09 | 1,52 | 0,09 | 1,59 | 0,09 |
| 12,0 | --- | --- | 2,73(*) | 0,02 | 2,77(*) | 0,02 | 2,56 | 0,02 | 2,49 | 0,02 | 2,60 | 0,02 |
| 14,0 | --- | --- | --- | --- | 4,39 | 0,00 | 4,06(*) | 0,00 | 3,95(*) | 0,00 | 4,12(*) | 0,00 |
| 16,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 6,00 | 0,00 | 5,84 | 0,00 | 6,10 | 0,00 |
| 18,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 7,53 | 0,00 | 7,87 | 0,00 |
| 20,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 9,01 | 0,00 |
| MSD | 0,067 | | 0,067 | | 0,067 | | 0,073 | | 0,075 | | 0,073 | |
| % reducción | 36,17 | | 36,25 | | 36,17 | | 39,43 | | 40,82 | | 39,69 | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un a= 0,05 en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> <p>** Análisis estadístico realizado a partir de los datos transformados logarítmicamente (log(x+1)).</p> <p>(⊗) Estadístico calculado mayor que el valor crítico (No distribución normal o No homogeneidad de la varianza)</p> | | | | | | | | | | | | |

Tabla A III.13.
Valores de del ensayo de *D. salina* y NP9EO a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de NP9EO estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expan. Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 3,1718 | -2,2080 | 0,6100 | 3,2963 | 7,2531 | 11,7425 | 1,9421 |
| | 25 | 8,7386 | -0,1946 | 4,4847 | 8,3734 | 10,9916 | 13,4699 | 1,7919 |
| | 50 | 12,5111 | 8,5608 | 10,6300 | 12,2922 | 13,3881 | 14,3529 | 0,7368 |
| | 75 | 14,6412 | 12,4926 | 13,6180 | 14,6475 | 16,3214 | 18,1697 | 0,6053 |
| | 95 | 16,6889 | 14,3791 | 15,5890 | 16,5802 | 17,6840 | 18,7786 | 0,7707 |
| 96 | 5 | 2,8300 | -2,0568 | 0,5030 | 3,1442 | 7,4179 | 12,4647 | 2,1554 |
| | 25 | 10,7756 | -3,5331 | 3,9619 | 9,4326 | 12,6836 | 14,7824 | 2,3962 |
| | 50 | 14,7046 | 11,1205 | 12,9979 | 14,5804 | 16,2793 | 18,0114 | 0,9183 |
| | 75 | 17,3915 | 14,2230 | 15,8827 | 17,3987 | 18,7377 | 20,2185 | 0,7633 |
| | 95 | 19,4565 | (**) | | 19,1184 | (**) | | 0,6639 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

(**) No es posible calcular límites de confianza

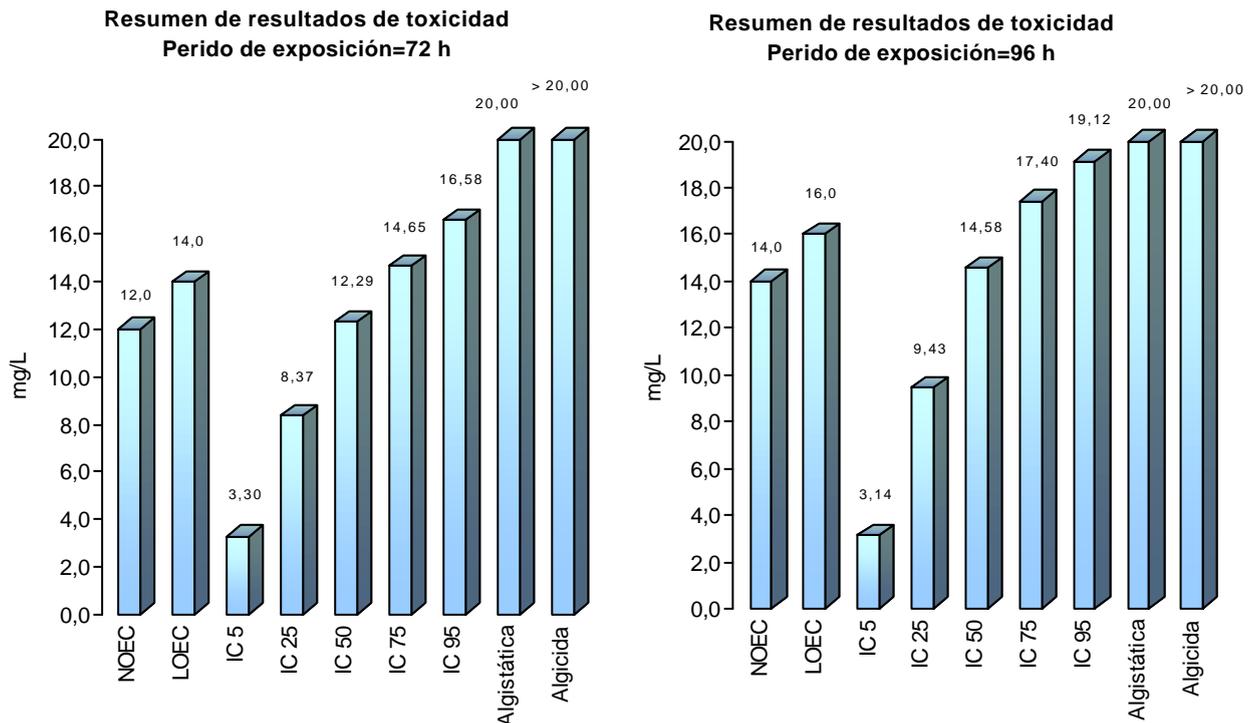
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUCIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de NP9EO ensayadas con *D. salina* (14, 16, 18 y 20 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa en todos los viales.

- Concentración alguistática= 20 mg/L
- Concentración algucida= No determinado experimentalmente

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del NP9EO y *D. salina*.



2.4. Chaetoceros gracilis

Tabla A III.14.

Evolución de la biomasa de Chaetoceros gracilis. Ensayo de NP9EO.

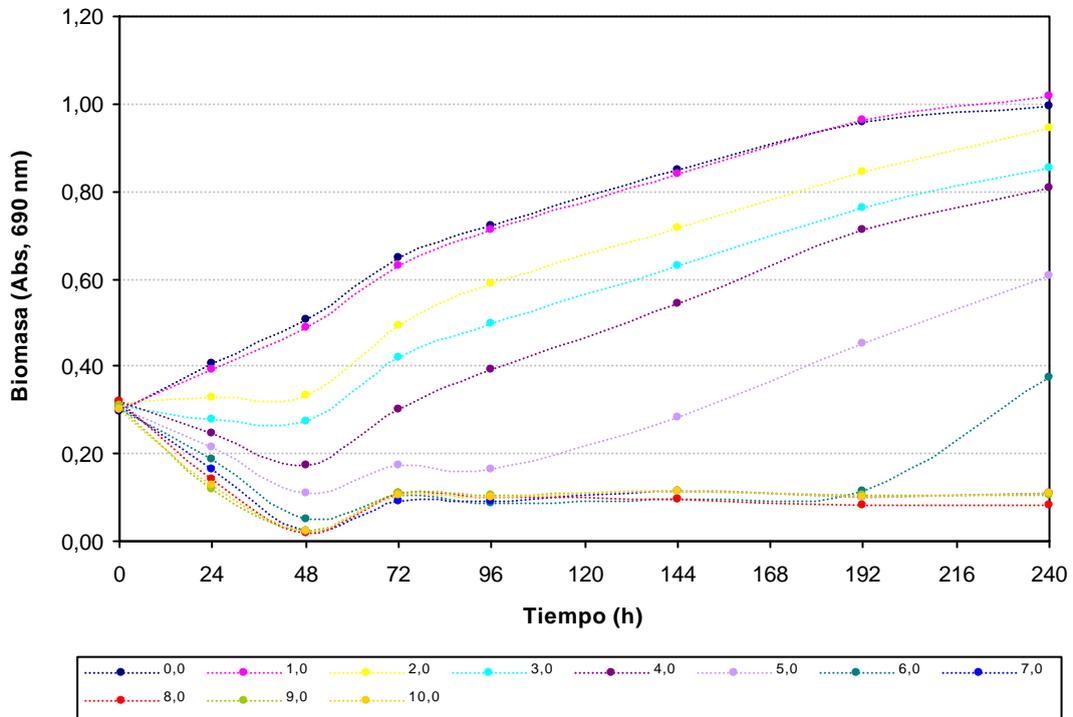
| | | C. gracilis. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | |
|------|--|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| t(d) | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| t(h) | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| | | 0,290 | 0,416 | 0,520 | 0,656 | 0,732 | | | | 0,000 | 0,126 | 0,230 | 0,366 | 0,442 | | | |
| 0,0 | | 0,308 | 0,414 | 0,512 | 0,639 | 0,732 | 0,849 | 0,957 | 0,994 | 0,000 | 0,106 | 0,204 | 0,331 | 0,424 | 0,541 | 0,649 | 0,686 |
| | | 0,285 | 0,388 | 0,492 | 0,647 | 0,698 | | | | 0,000 | 0,103 | 0,207 | 0,362 | 0,413 | | | |
| | | 0,302 | 0,417 | 0,521 | 0,656 | 0,716 | | | | 0,000 | 0,115 | 0,219 | 0,354 | 0,414 | | | |
| 1,0 | | 0,312 | 0,405 | 0,508 | 0,637 | 0,729 | 0,838 | 0,963 | 1,016 | 0,000 | 0,093 | 0,196 | 0,325 | 0,417 | 0,526 | 0,651 | 0,704 |
| | | 0,294 | 0,355 | 0,429 | 0,593 | 0,688 | | | | 0,000 | 0,061 | 0,135 | 0,299 | 0,394 | | | |
| | | 0,321 | 0,343 | 0,343 | 0,515 | 0,629 | | | | 0,000 | 0,022 | 0,022 | 0,194 | 0,308 | | | |
| 2,0 | | 0,313 | 0,327 | 0,333 | 0,499 | 0,591 | 0,718 | 0,843 | 0,945 | 0,000 | 0,014 | 0,020 | 0,186 | 0,278 | 0,405 | 0,530 | 0,632 |
| | | 0,312 | 0,316 | 0,323 | 0,467 | 0,542 | | | | 0,000 | 0,004 | 0,011 | 0,155 | 0,230 | | | |
| | | 0,316 | 0,293 | 0,302 | 0,431 | 0,549 | | | | 0,000 | -0,023 | -0,014 | 0,115 | 0,233 | | | |
| 3,0 | | 0,317 | 0,278 | 0,259 | 0,430 | 0,485 | 0,629 | 0,764 | 0,851 | 0,000 | -0,039 | -0,058 | 0,113 | 0,168 | 0,312 | 0,447 | 0,534 |
| | | 0,300 | 0,268 | 0,265 | 0,396 | 0,459 | | | | 0,000 | -0,032 | -0,035 | 0,096 | 0,159 | | | |
| | | 0,324 | 0,251 | 0,169 | 0,305 | 0,400 | | | | 0,000 | -0,073 | -0,155 | -0,019 | 0,076 | | | |
| 4,0 | | 0,325 | 0,260 | 0,198 | 0,330 | 0,436 | 0,541 | 0,713 | 0,809 | 0,000 | -0,065 | -0,127 | 0,005 | 0,111 | 0,216 | 0,388 | 0,484 |
| | | 0,307 | 0,228 | 0,148 | 0,270 | 0,347 | | | | 0,000 | -0,079 | -0,159 | -0,037 | 0,040 | | | |
| | | 0,317 | 0,222 | 0,093 | 0,151 | 0,132 | | | | 0,000 | -0,095 | -0,224 | -0,166 | -0,185 | | | |
| 5,0 | | 0,303 | 0,214 | 0,129 | 0,188 | 0,181 | 0,284 | 0,450 | 0,605 | 0,000 | -0,089 | -0,174 | -0,115 | -0,122 | -0,019 | 0,147 | 0,302 |
| | | 0,297 | 0,206 | 0,110 | 0,183 | 0,180 | | | | 0,000 | -0,091 | -0,187 | -0,114 | -0,117 | | | |
| | | 0,298 | 0,189 | 0,037 | 0,099 | 0,087 | | | | 0,000 | -0,109 | -0,261 | -0,199 | -0,211 | | | |
| 6,0 | | 0,316 | 0,190 | 0,054 | 0,117 | 0,095 | 0,096 | 0,116 | 0,375 | 0,000 | -0,126 | -0,262 | -0,199 | -0,221 | -0,220 | -0,200 | 0,059 |
| | | 0,296 | 0,183 | 0,053 | 0,105 | 0,081 | | | | 0,000 | -0,113 | -0,243 | -0,191 | -0,215 | | | |
| | | 0,306 | 0,155 | 0,016 | 0,084 | 0,082 | | | | 0,000 | -0,151 | -0,290 | -0,222 | -0,224 | | | |
| 7,0 | | 0,322 | 0,181 | 0,035 | 0,112 | 0,103 | 0,112 | 0,101 | 0,111 | 0,000 | -0,141 | -0,287 | -0,210 | -0,219 | -0,210 | -0,221 | -0,211 |
| | | 0,300 | 0,155 | 0,020 | 0,084 | 0,089 | | | | 0,000 | -0,145 | -0,280 | -0,216 | -0,211 | | | |
| | | 0,317 | 0,136 | 0,016 | 0,125 | 0,119 | | | | 0,000 | -0,181 | -0,301 | -0,192 | -0,198 | | | |
| 8,0 | | 0,303 | 0,131 | 0,010 | 0,084 | 0,079 | 0,094 | 0,080 | 0,082 | 0,000 | -0,172 | -0,293 | -0,219 | -0,224 | -0,209 | -0,223 | -0,221 |
| | | 0,345 | 0,160 | 0,027 | 0,122 | 0,106 | | | | 0,000 | -0,185 | -0,318 | -0,223 | -0,239 | | | |
| | | 0,309 | 0,105 | 0,010 | 0,098 | 0,095 | | | | 0,000 | -0,204 | -0,299 | -0,211 | -0,214 | | | |
| 9,0 | | 0,312 | 0,127 | 0,028 | 0,119 | 0,112 | 0,115 | 0,106 | 0,107 | 0,000 | -0,185 | -0,284 | -0,193 | -0,200 | -0,197 | -0,206 | -0,205 |
| | | 0,311 | 0,120 | 0,026 | 0,109 | 0,107 | | | | 0,000 | -0,191 | -0,285 | -0,202 | -0,204 | | | |
| | | 0,305 | 0,122 | 0,020 | 0,107 | 0,101 | | | | 0,000 | -0,183 | -0,285 | -0,198 | -0,204 | | | |
| 10,0 | | 0,312 | 0,131 | 0,031 | 0,118 | 0,113 | 0,113 | 0,102 | 0,108 | 0,000 | -0,181 | -0,281 | -0,194 | -0,199 | -0,199 | -0,210 | -0,204 |
| | | 0,281 | 0,124 | 0,011 | 0,083 | 0,091 | | | | 0,000 | -0,157 | -0,270 | -0,198 | -0,190 | | | |

Tabla A III.15.

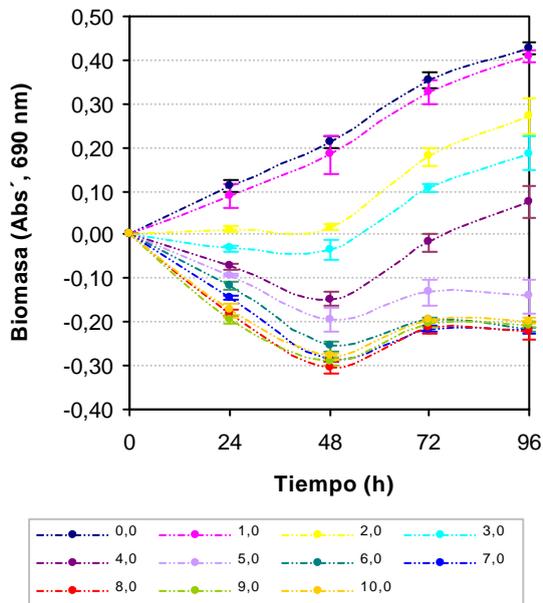
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs')

| t (h) | mg/L NP9EO | | | | | | | | | | | Promedio |
|-------|------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| | 0,0 | 1,0 | 2,0 | 3,0 | 4,0 | 5,0 | 6,0 | 7,0 | 8,0 | 9,0 | 10,0 | |
| 24 | 0,112 | 0,090 | 0,013 | -0,031 | -0,072 | -0,092 | -0,116 | -0,146 | -0,179 | -0,193 | -0,174 | Promedio |
| | 0,013 | 0,027 | 0,009 | 0,008 | 0,007 | 0,003 | 0,009 | 0,005 | 0,007 | 0,010 | 0,014 | DesvEst |
| 48 | 0,214 | 0,183 | 0,018 | -0,036 | -0,147 | -0,195 | -0,255 | -0,286 | -0,304 | -0,289 | -0,279 | Promedio |
| | 0,014 | 0,043 | 0,006 | 0,022 | 0,017 | 0,026 | 0,011 | 0,005 | 0,013 | 0,008 | 0,008 | DesvEst |
| 72 | 0,353 | 0,326 | 0,178 | 0,108 | -0,017 | -0,132 | -0,196 | -0,216 | -0,211 | -0,202 | -0,197 | Promedio |
| | 0,019 | 0,028 | 0,021 | 0,010 | 0,021 | 0,030 | 0,005 | 0,006 | 0,017 | 0,009 | 0,002 | DesvEst |
| 96 | 0,426 | 0,408 | 0,272 | 0,187 | 0,076 | -0,141 | -0,216 | -0,218 | -0,220 | -0,206 | -0,198 | Promedio |
| | 0,015 | 0,013 | 0,039 | 0,040 | 0,036 | 0,038 | 0,005 | 0,007 | 0,021 | 0,007 | 0,007 | DesvEst |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

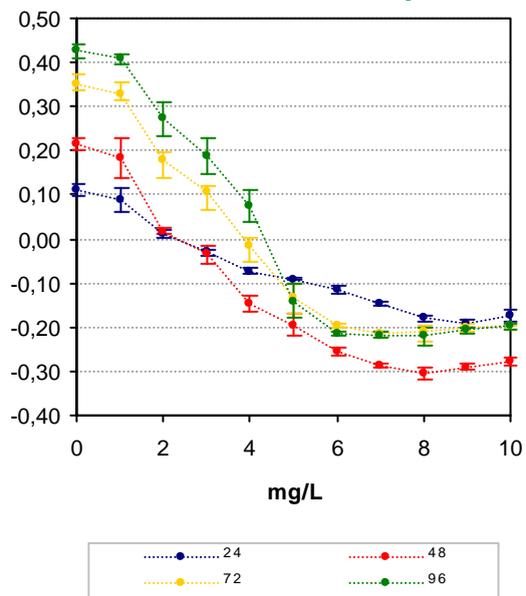


Tabla A III.16.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *C. gracilis* expuesta a diferentes concentraciones de NP9EO.

| <i>C. gracilis</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|--|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,964 | | 0,965 | | 0,976 | | 0,970 | |
| B calculado | 11,50 | | 14,63 | | 14,54 | | 17,38 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L NP9EO | t _i | p |
| 1,0 | 2,27 | 0,13572 | 1,94 | 0,15708 | 1,88 | 0,11776 | 0,88 | 0,09034 |
| 2,0 | 10,14 (*) | 0,00019 | 12,56 (*) | 0,00001 | 12,14 (*) | 0,00021 | 7,58 (*) | 0,00156 |
| 3,0 | 14,75 | 0,00004 | 15,98 | 0,00004 | 17,03 | 0,00002 | 11,77 | 0,00032 |
| 4,0 | 18,98 | 0,00001 | 23,12 | 0,00001 | 25,72 | 0,00001 | 17,21 | 0,00005 |
| 5,0 | 20,98 | 0,00001 | 26,19 | 0,00001 | 33,70 | 0,00001 | 27,87 | 0,00001 |
| 6,0 | 23,49 | 0,00001 | 30,06 | 0,00000 | 38,19 | 0,00000 | 31,52 | 0,00000 |
| 7,0 | 26,55 | 0,00000 | 32,00 | 0,00000 | 39,56 | 0,00000 | 31,63 | 0,00000 |
| 8,0 | 30,02 | 0,00000 | 33,18 | 0,00000 | 39,23 | 0,00000 | 31,75 | 0,00000 |
| 9,0 | 31,47 | 0,00000 | 32,24 | 0,00000 | 38,59 | 0,00000 | 31,04 | 0,00000 |
| 10,0 | 29,44 | 0,00001 | 31,56 | 0,00000 | 38,21 | 0,00000 | 30,63 | 0,00000 |
| MSD | 0,026 | | 0,041 | | 0,038 | | 0,054 | |
| % reducción | 22,92 | | 19,28 | | 10,76 | | 12,61 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,935 | | 0,954 | | 0,962 | | 0,973 | | 0,976 | | 0,976 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 1,85 | | 5,41 | | 7,96 | | 8,06 | | 9,25 | | 14,54 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L NP9EO | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 1,0 | 1,48 | 0,12 | 1,60 | 0,12 | 1,70 | 0,12 | 1,72 | 0,12 | 1,79 | 0,12 | 1,88 | 0,12 |
| 2,0 | 9,59(*) | 0,00 | 10,32(*) | 0,00 | 10,97(*) | 0,00 | 11,13(*) | 0,00 | 11,59(*) | 0,00 | 12,14(*) | 0,00 |
| 3,0 | 13,45 | 0,00 | 14,48 | 0,00 | 15,39 | 0,00 | 15,61 | 0,00 | 16,25 | 0,00 | 17,03 | 0,00 |
| 4,0 | 20,31 | 0,00 | 21,86 | 0,00 | 23,23 | 0,00 | 23,57 | 0,00 | 24,55 | 0,00 | 25,72 | 0,00 |
| 5,0 | 26,61 | 0,00 | 28,64 | 0,00 | 30,44 | 0,00 | 30,87 | 0,00 | 32,15 | 0,00 | 33,70 | 0,00 |
| 6,0 | --- | --- | 32,46 | 0,00 | 34,50 | 0,00 | 34,99 | 0,00 | 36,44 | 0,00 | 38,19 | 0,00 |
| 7,0 | --- | --- | --- | --- | 35,73 | 0,00 | 36,24 | 0,00 | 37,75 | 0,00 | 39,56 | 0,00 |
| 8,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 35,95 | 0,00 | 37,44 | 0,00 | 39,23 | 0,00 |
| 9,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 36,82 | 0,00 | 38,59 | 0,00 |
| 10,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 38,21 | 0,00 |
| MSD | 0,046 | | 0,043 | | 0,041 | | 0,041 | | 0,039 | | 0,038 | |
| % reducción | 12,90 | | 12,13 | | 11,55 | | 11,47 | | 11,10 | | 10,76 | |
| * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | | | | | |

Tabla A III.17.
Valores de ICp del ensayo de *C. gracilis* NP9EO a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de NP9EO estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expan. Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,6537 | -0,0473 | 0,3199 | 0,7210 | 1,1069 | 1,6053 | 0,2719 |
| | 25 | 1,4148 | 1,0985 | 1,2642 | 1,4100 | 1,5419 | 1,6816 | 0,0736 |
| | 50 | 2,0261 | 1,7076 | 1,8743 | 2,0420 | 2,2480 | 2,4921 | 0,1030 |
| | 75 | 3,1829 | 3,0088 | 3,1000 | 3,1821 | 3,2551 | 3,3345 | 0,0441 |
| | 95 | 3,8366 | 3,7937 | 3,8161 | 3,8376 | 3,8730 | 3,9130 | 0,0116 |
| 96 | 5 | 2,0805 | -0,6858 | 0,7632 | 1,9531 | 2,0868 | 2,0937 | 0,3356 |
| | 25 | 2,4027 | 2,1907 | 2,3017 | 2,3809 | 2,4358 | 2,4723 | 0,0341 |
| | 50 | 2,8053 | 2,6132 | 2,7139 | 2,7945 | 2,8759 | 2,9536 | 0,0420 |
| | 75 | 3,3529 | 3,0635 | 3,2151 | 3,3412 | 3,4354 | 3,5263 | 0,0573 |
| | 95 | 3,8994 | 3,8013 | 3,8527 | 3,8991 | 3,9537 | 4,0134 | 0,0284 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; DesvEst.: Desviación estándar

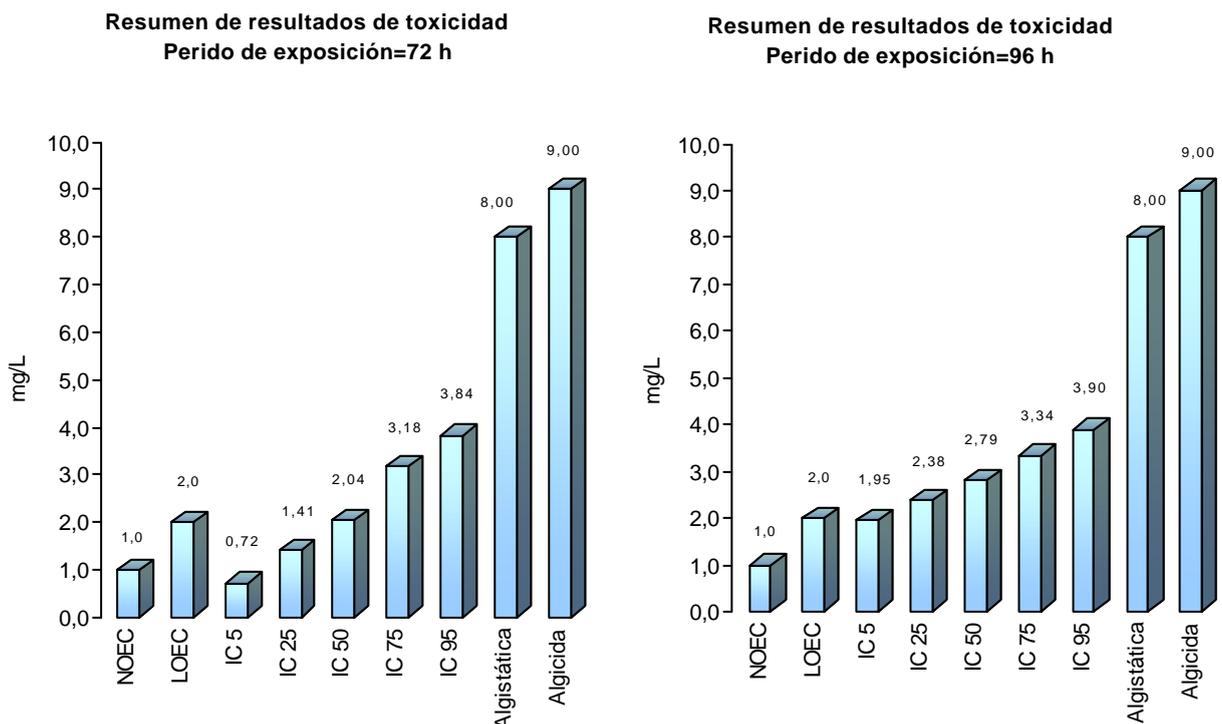
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de NP9EO ensayadas con *C. gracilis* (7, 8, 9 y 10 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo no se observó cambio significativo en la turbidez de los viales correspondientes a 9 y 10 mg/L, un aumento muy pequeño de la turbidez del vial de 8 mg/L, y un aumento considerable de la biomasa en 7 mg/L. Puesto que el resultado en el vial correspondiente al estudio de 8 mg/L no quedó definitivo, se optó por tomar como concentraciones alguistáticas y alguicidas las siguientes concentraciones:

- Concentración alguistática= 8 mg/L
- Concentración alguicida= 9 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del NP9EO y *C. gracilis*.



2.5. Tetraselmis chuii

Tabla A III.18.

Evolución de la biomasa de Tetraselmis chuii. Ensayo de NP9EO.

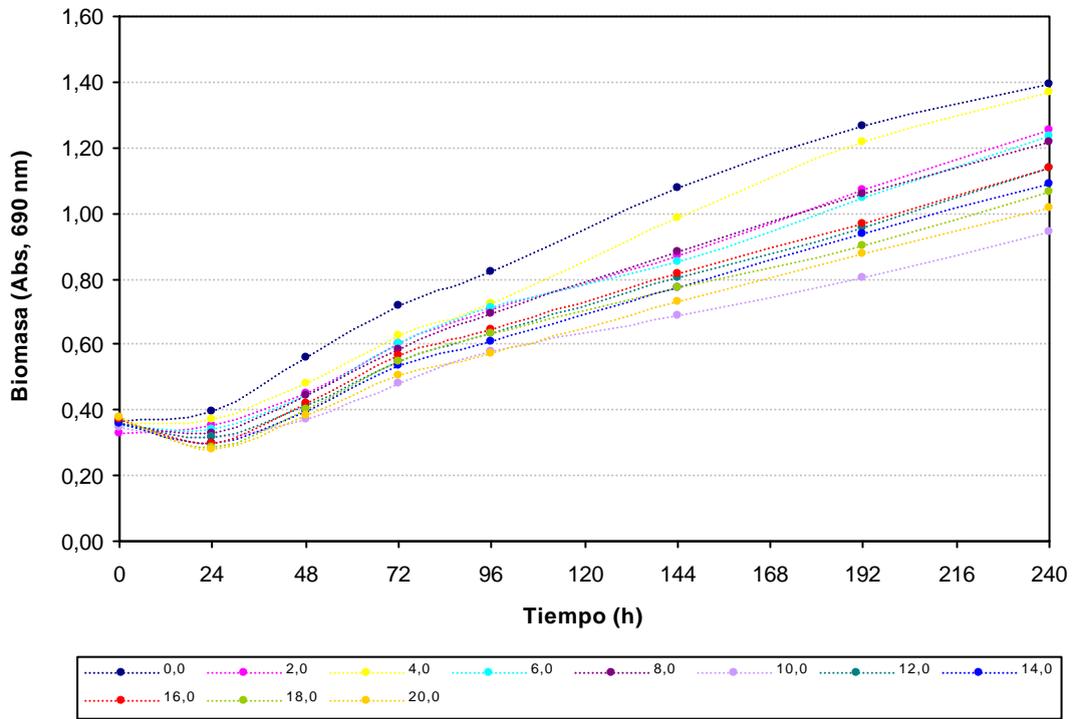
| <u>T. chuii</u>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| | 0,349 | 0,413 | 0,547 | 0,691 | 0,794 | | | | 0,000 | 0,064 | 0,198 | 0,342 | 0,445 | | | | |
| 0,0 | 0,360 | 0,388 | 0,590 | 0,772 | 0,887 | 1,079 | 1,264 | 1,391 | 0,000 | 0,028 | 0,230 | 0,412 | 0,527 | 0,719 | 0,904 | 1,031 | |
| | 0,390 | 0,380 | 0,534 | 0,690 | 0,789 | | | | 0,000 | -0,010 | 0,144 | 0,300 | 0,399 | | | | |
| | 0,336 | 0,376 | 0,490 | 0,647 | 0,763 | | | | 0,000 | 0,040 | 0,154 | 0,311 | 0,427 | | | | |
| 2,0 | 0,335 | 0,357 | 0,469 | 0,623 | 0,725 | 0,871 | 1,072 | 1,256 | 0,000 | 0,022 | 0,134 | 0,288 | 0,390 | 0,536 | 0,737 | 0,921 | |
| | 0,323 | 0,317 | 0,399 | 0,532 | 0,624 | | | | 0,000 | -0,006 | 0,076 | 0,209 | 0,301 | | | | |
| | 0,341 | 0,374 | 0,466 | 0,582 | 0,680 | | | | 0,000 | 0,033 | 0,125 | 0,241 | 0,339 | | | | |
| 4,0 | 0,393 | 0,397 | 0,542 | 0,737 | 0,816 | 0,988 | 1,218 | 1,370 | 0,000 | 0,004 | 0,149 | 0,344 | 0,423 | 0,595 | 0,825 | 0,977 | |
| | 0,351 | 0,347 | 0,436 | 0,568 | 0,677 | | | | 0,000 | -0,004 | 0,085 | 0,217 | 0,326 | | | | |
| | 0,347 | 0,341 | 0,444 | 0,600 | 0,725 | | | | 0,000 | -0,006 | 0,097 | 0,253 | 0,378 | | | | |
| 6,0 | 0,349 | 0,349 | 0,453 | 0,611 | 0,731 | 0,853 | 1,049 | 1,237 | 0,000 | 0,000 | 0,104 | 0,262 | 0,382 | 0,504 | 0,700 | 0,888 | |
| | 0,369 | 0,326 | 0,441 | 0,587 | 0,685 | | | | 0,000 | -0,043 | 0,072 | 0,218 | 0,316 | | | | |
| | 0,339 | 0,348 | 0,448 | 0,554 | 0,671 | | | | 0,000 | 0,009 | 0,109 | 0,215 | 0,332 | | | | |
| 8,0 | 0,373 | 0,341 | 0,448 | 0,621 | 0,732 | 0,883 | 1,056 | 1,216 | 0,000 | -0,032 | 0,075 | 0,248 | 0,359 | 0,510 | 0,683 | 0,843 | |
| | 0,358 | 0,305 | 0,431 | 0,568 | 0,686 | | | | 0,000 | -0,053 | 0,073 | 0,210 | 0,328 | | | | |
| | 0,360 | 0,346 | 0,389 | 0,525 | 0,633 | | | | 0,000 | -0,014 | 0,029 | 0,165 | 0,273 | | | | |
| 10,0 | 0,334 | 0,293 | 0,355 | 0,469 | 0,557 | 0,690 | 0,801 | 0,946 | 0,000 | -0,041 | 0,021 | 0,135 | 0,223 | 0,356 | 0,467 | 0,612 | |
| | 0,344 | 0,312 | 0,363 | 0,445 | 0,538 | | | | 0,000 | -0,032 | 0,019 | 0,101 | 0,194 | | | | |
| | 0,332 | 0,283 | 0,368 | 0,510 | 0,591 | | | | 0,000 | -0,049 | 0,036 | 0,178 | 0,259 | | | | |
| 12,0 | 0,366 | 0,334 | 0,437 | 0,572 | 0,651 | 0,805 | 0,958 | 1,139 | 0,000 | -0,032 | 0,071 | 0,206 | 0,285 | 0,439 | 0,592 | 0,773 | |
| | 0,372 | 0,325 | 0,428 | 0,569 | 0,659 | | | | 0,000 | -0,047 | 0,056 | 0,197 | 0,287 | | | | |
| | 0,348 | 0,293 | 0,392 | 0,545 | 0,634 | | | | 0,000 | -0,055 | 0,044 | 0,197 | 0,286 | | | | |
| 14,0 | 0,364 | 0,306 | 0,408 | 0,557 | 0,638 | 0,774 | 0,935 | 1,088 | 0,000 | -0,058 | 0,044 | 0,193 | 0,274 | 0,410 | 0,571 | 0,724 | |
| | 0,365 | 0,288 | 0,378 | 0,501 | 0,552 | | | | 0,000 | -0,077 | 0,013 | 0,136 | 0,187 | | | | |
| | 0,354 | 0,299 | 0,403 | 0,545 | 0,600 | | | | 0,000 | -0,055 | 0,049 | 0,191 | 0,246 | | | | |
| 16,0 | 0,374 | 0,302 | 0,430 | 0,572 | 0,657 | 0,813 | 0,967 | 1,135 | 0,000 | -0,072 | 0,056 | 0,198 | 0,283 | 0,439 | 0,593 | 0,761 | |
| | 0,394 | 0,290 | 0,419 | 0,573 | 0,685 | | | | 0,000 | -0,104 | 0,025 | 0,179 | 0,291 | | | | |
| | 0,390 | 0,300 | 0,392 | 0,538 | 0,610 | | | | 0,000 | -0,090 | 0,002 | 0,148 | 0,220 | | | | |
| 18,0 | 0,362 | 0,276 | 0,399 | 0,540 | 0,621 | 0,773 | 0,902 | 1,062 | 0,000 | -0,086 | 0,037 | 0,178 | 0,259 | 0,411 | 0,540 | 0,700 | |
| | 0,375 | 0,282 | 0,405 | 0,557 | 0,663 | | | | 0,000 | -0,093 | 0,030 | 0,182 | 0,288 | | | | |
| | 0,378 | 0,291 | 0,415 | 0,547 | 0,605 | | | | 0,000 | -0,087 | 0,037 | 0,169 | 0,227 | | | | |
| 20,0 | 0,363 | 0,262 | 0,376 | 0,511 | 0,587 | 0,729 | 0,878 | 1,015 | 0,000 | -0,101 | 0,013 | 0,148 | 0,224 | 0,366 | 0,515 | 0,652 | |
| | 0,391 | 0,282 | 0,363 | 0,465 | 0,532 | | | | 0,000 | -0,109 | -0,028 | 0,074 | 0,141 | | | | |

Tabla A III.19.

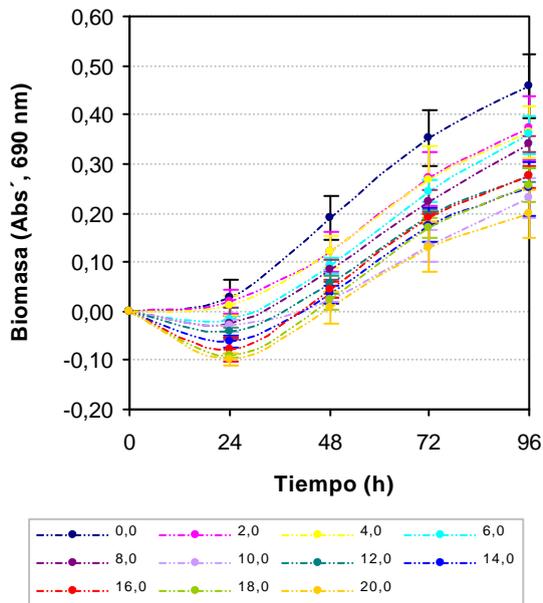
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs')

| t (h) | mg/L NP9EO | | | | | | | | | | | Promedio | DesvEst |
|-------|------------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|---------|
| | 0,0 | 2,0 | 4,0 | 6,0 | 8,0 | 10,0 | 12,0 | 14,0 | 16,0 | 18,0 | 20,0 | | |
| 24 | 0,027 | 0,019 | 0,011 | -0,016 | -0,025 | -0,029 | -0,043 | -0,063 | -0,077 | -0,090 | -0,099 | | |
| | 0,037 | 0,023 | 0,019 | 0,023 | 0,032 | 0,014 | 0,009 | 0,012 | 0,025 | 0,004 | 0,011 | | |
| 48 | 0,191 | 0,121 | 0,120 | 0,091 | 0,086 | 0,023 | 0,054 | 0,034 | 0,043 | 0,023 | 0,007 | | |
| | 0,043 | 0,041 | 0,032 | 0,017 | 0,020 | 0,005 | 0,018 | 0,018 | 0,016 | 0,019 | 0,033 | | |
| 72 | 0,351 | 0,269 | 0,267 | 0,244 | 0,224 | 0,134 | 0,194 | 0,175 | 0,189 | 0,169 | 0,130 | | |
| | 0,057 | 0,054 | 0,067 | 0,023 | 0,021 | 0,032 | 0,014 | 0,034 | 0,010 | 0,019 | 0,050 | | |
| 96 | 0,457 | 0,373 | 0,363 | 0,359 | 0,340 | 0,230 | 0,277 | 0,249 | 0,273 | 0,256 | 0,197 | | |
| | 0,065 | 0,065 | 0,053 | 0,037 | 0,017 | 0,040 | 0,016 | 0,054 | 0,024 | 0,034 | 0,049 | | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

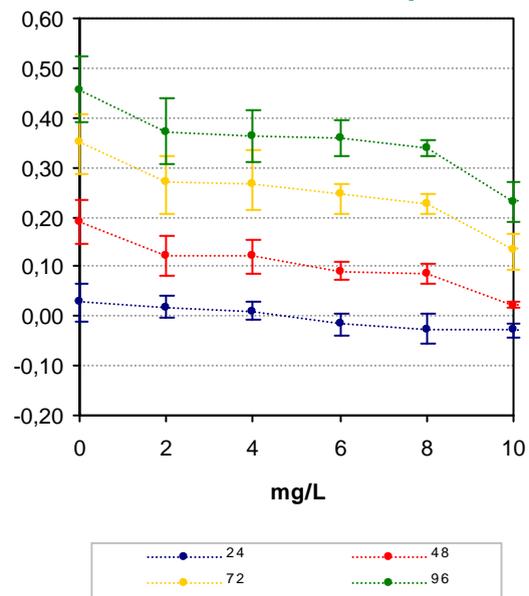


Tabla A III.20.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *T. chuii* expuesta a diferentes concentraciones de NP9EO.

| <i>T. chuii</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|--|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,982 | | 0,953 | | 0,976 | | 0,972 | |
| B calculado | 10,56 | | 8,71 | | 10,84 | | 6,66 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L NP9EO | t _i | p |
| 2,0 | 0,50 | 0,37416 | 3,23 (*) | 0,05668 | 2,56 | 0,07111 | 2,33 | 0,09309 |
| 4,0 | 0,94 | 0,26789 | 3,31 | 0,04286 | 2,62 | 0,08691 | 2,60 | 0,06104 |
| 6,0 | 2,51 | 0,07936 | 4,64 | 0,01038 | 3,34 (*) | 0,01939 | 2,71 (*) | 0,04233 |
| 8,0 | 3,03 (*) | 0,06693 | 4,89 | 0,00961 | 3,97 | 0,01086 | 3,23 | 0,01932 |
| 10,0 | 3,24 | 0,03441 | 7,81 | 0,00134 | 6,80 | 0,00220 | 6,26 | 0,00334 |
| 12,0 | 4,02 | 0,01680 | 6,35 | 0,00365 | 4,93 | 0,00473 | 4,96 | 0,00474 |
| 14,0 | 5,21 | 0,00781 | 7,31 | 0,00222 | 5,50 | 0,00496 | 5,73 | 0,00648 |
| 16,0 | 6,00 | 0,00772 | 6,86 | 0,00267 | 5,06 | 0,00405 | 5,06 | 0,00501 |
| 18,0 | 6,72 | 0,00275 | 7,81 | 0,00178 | 5,69 | 0,00306 | 5,55 | 0,00445 |
| 20,0 | 7,26 | 0,00240 | 8,54 | 0,00216 | 6,90 | 0,00356 | 7,16 | 0,00259 |
| MSD | 0,046 | | 0,057 | | 0,085 | | 0,096 | |
| % reducción | 168,06 | | 29,74 | | 24,05 | | 20,95 | |
| <p><i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1. y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola).</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,976 | | 0,982 | | 0,980 | | 0,981 | | 0,979 | | 0,976 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 3,64 | | 5,93 | | 6,08 | | 9,39 | | 10,58 | | 10,84 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L NP9EO | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 2,0 | 2,19 | 0,07 | 2,35 | 0,07 | 2,40 | 0,07 | 2,54 | 0,07 | 2,65(*) | 0,07 | 2,56 | 0,07 |
| 4,0 | 2,24 | 0,09 | 2,40 | 0,09 | 2,46 | 0,09 | 2,60(*) | 0,09 | 2,71 | 0,09 | 2,62 | 0,09 |
| 6,0 | 2,86(*) | 0,02 | 3,06(*) | 0,02 | 3,14(*) | 0,02 | 3,31 | 0,02 | 3,45 | 0,02 | 3,34(*) | 0,02 |
| 8,0 | 3,39 | 0,01 | 3,64 | 0,01 | 3,72 | 0,01 | 3,93 | 0,01 | 4,10 | 0,01 | 3,97 | 0,01 |
| 10,0 | 5,82 | 0,00 | 6,23 | 0,00 | 6,38 | 0,00 | 6,74 | 0,00 | 7,02 | 0,00 | 6,80 | 0,00 |
| 12,0 | --- | --- | 4,51 | 0,00 | 4,62 | 0,00 | 4,88 | 0,00 | 5,09 | 0,00 | 4,93 | 0,00 |
| 14,0 | --- | --- | --- | --- | 5,16 | 0,00 | 5,45 | 0,00 | 5,68 | 0,00 | 5,50 | 0,00 |
| 16,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 5,02 | 0,00 | 5,23 | 0,00 | 5,06 | 0,00 |
| 18,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 5,87 | 0,00 | 5,69 | 0,00 |
| 20,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 6,90 | 0,00 |
| MSD | 0,094 | | 0,088 | | 0,087 | | 0,083 | | 0,081 | | 0,085 | |
| % reducción | 26,63 | | 25,15 | | 24,87 | | 23,71 | | 22,94 | | 24,05 | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | | | | | |

Tabla A III.21.
Valores de ICp del ensayo de *T. chuii* y NP9EO a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de NP9EO estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expan. Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,4285 | 0,1214 | 0,2822 | 0,6746 | 2,7529 | 5,3099 | 0,6704 |
| | 25 | 4,3333 | -1,8821 | 1,3736 | 3,9212 | 8,0420 | 12,1214 | 2,0692 |
| | 50 | 9,8961 | (**) | (**) | 13,3023 | (**) | (*) | 4,2402 |
| | 75 | (*) | | | | | | |
| | 95 | (*) | | | | | | |
| 96 | 5 | 0,5419 | 0,1124 | 0,3374 | 0,8437 | 2,9529 | 5,6049 | 0,7498 |
| | 25 | 7,6754 | -4,9659 | 1,6557 | 6,2822 | 8,9879 | 10,4317 | 2,5339 |
| | 50 | 18,9314 | (**) | (**) | 18,2046 | (**) | (*) | 2,1026 |
| | 75 | (*) | | | | | | |
| | 95 | (*) | | | | | | |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

(*) No es posible realizar la interpolación lineal del conjunto de datos para este porcentaje de respuesta
 (**) No es posible calcular límites de confianza

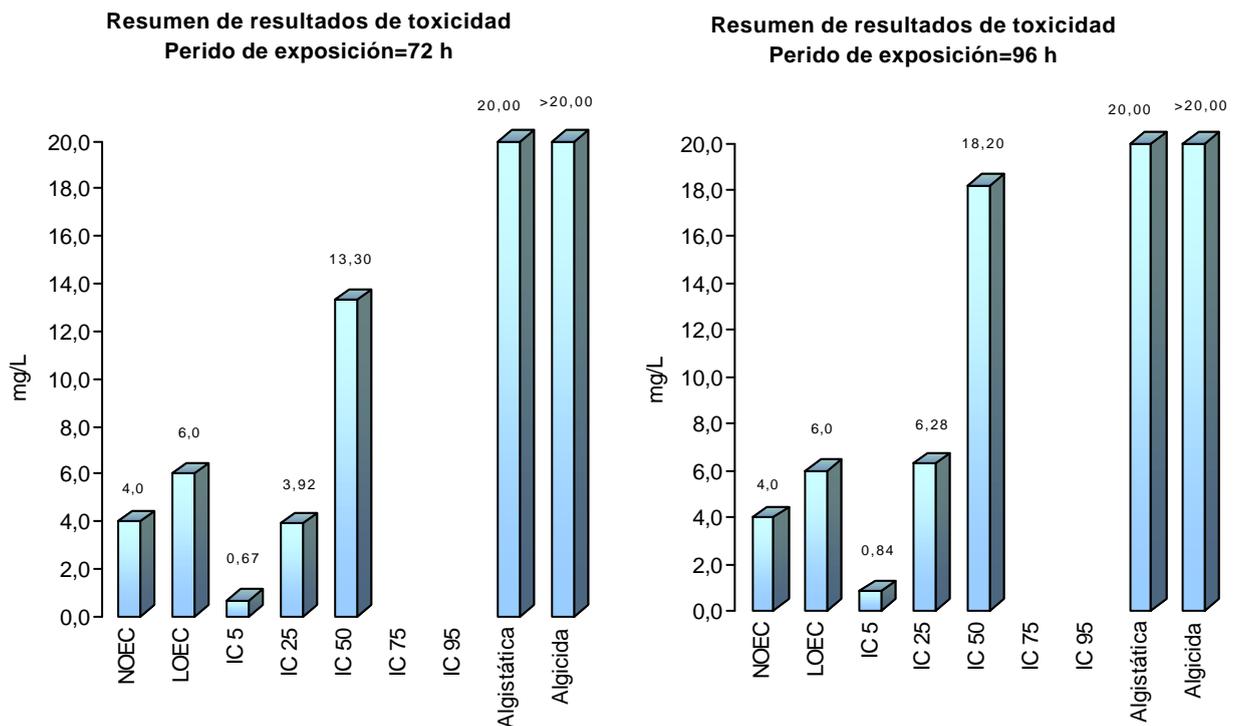
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de NP9EO ensayadas con *T. chuii* (14, 16, 18 y 20 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa en todos los viales.

- Concentración alguistática= 20 mg/L
- Concentración alguicida= No determinado experimentalmente

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del NP9EO y *T. chuii*.



3. RESULTADOS CON *ARTEMIA*

3.1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Recipiente de ensayo: placas petri de vidrio
- N° de réplicas: 5 para cada concentración y control
- N° de organismos por placa: 10
- Volumen de las placas: 30 mL
- Volumen de solución de ensayo: 20 mL
- Agua de dilución: agua de mar sintética
- Medio nutriente adicional: no
- Temperatura de ensayo: $20 \pm 0,1$ °C
- Iluminación: no, oscuridad
- Aireación: no
- Duración del ensayo: 3 días
- Respuesta observada: mortalidad, inhibición en la capacidad natatoria

ORGANISMOS DE ENSAYO

- *Artemia franciscana*, código 1309 según clasificación del Instituto de la *Artemia*, Bélgica obtenidos a partir de la eclosión de quistes de resistencia en condiciones óptimas de luz (iluminación constante), aireación (continua) y temperatura ($20 \pm 0,1$ °C).
- Nauplios de una misma cohorte de *Artemia franciscana* de entre 6 a 12 horas de vida (estadio I)

RESULTADOS OBTENIDOS

- Número de supervivientes a las 24, 48 y 72 horas de ensayo
- LC_p mediante el método Probit

3.2 RESULTADOS OBTENIDOS

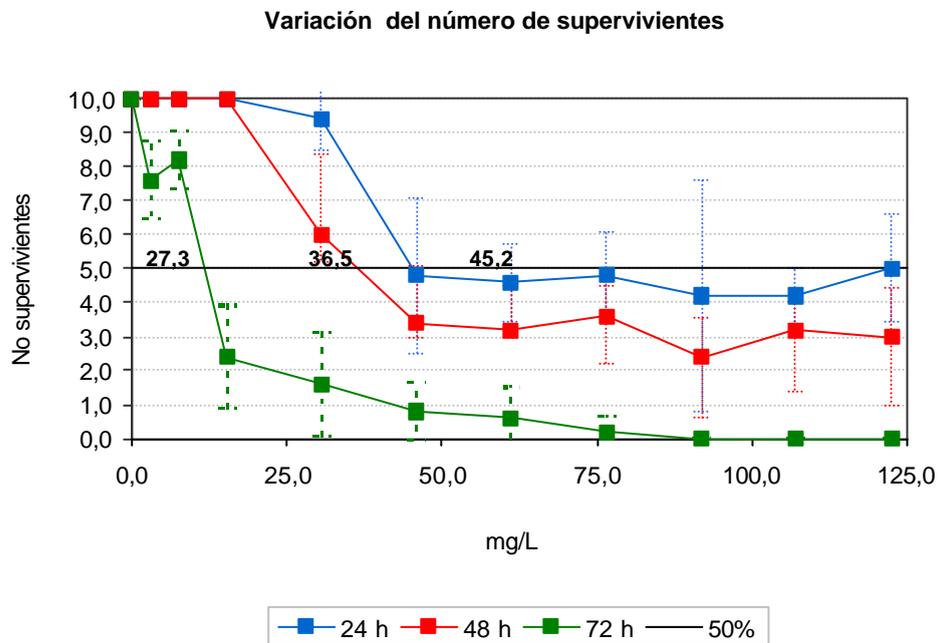
Tabla A III.22.
Ensayos de toxicidad aguda con *Artemia*. Ensayo de NP9EO.

| | 24 h | | | 48 h | | | 72 h | | | N Total |
|---------|------|---|---|------|---|---|------|---|----|---------|
| | + | ± | - | + | ± | - | + | ± | - | |
| Control | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| 3,1 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| 7,6 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| 15,3 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| 30,6 | 10 | 0 | 0 | 8 | 2 | 0 | 4 | 1 | 5 | 10 |
| | 8 | 0 | 2 | 5 | 0 | 5 | 3 | 0 | 7 | 10 |
| | 7 | 3 | 0 | 4 | 0 | 6 | 2 | 0 | 8 | 10 |
| | 7 | 2 | 1 | 4 | 1 | 5 | 3 | 0 | 7 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 5 | 1 | 4 | 4 | 1 | 5 | 10 |
| 45,9 | 5 | 1 | 4 | 3 | 1 | 6 | 2 | 0 | 8 | 10 |
| | 7 | 1 | 2 | 6 | 0 | 4 | 0 | 2 | 8 | 10 |
| | 1 | 3 | 6 | 3 | 0 | 7 | 0 | 2 | 8 | 10 |
| | 3 | 1 | 6 | 2 | 0 | 8 | 0 | 1 | 9 | 10 |
| | 1 | 1 | 8 | 1 | 1 | 8 | 0 | 1 | 9 | 10 |
| 61,2 | 4 | 1 | 5 | 4 | 1 | 5 | 0 | 1 | 8 | 10 |
| | 5 | 0 | 5 | 2 | 0 | 8 | 1 | 1 | 8 | 10 |
| | 5 | 1 | 4 | 3 | 0 | 7 | 0 | 2 | 8 | 10 |
| | 4 | 0 | 6 | 4 | 0 | 6 | 1 | 2 | 7 | 10 |
| | 2 | 1 | 7 | 2 | 0 | 8 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| 76,6 | 4 | 2 | 4 | 3 | 1 | 6 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| | 2 | 4 | 4 | 1 | 1 | 8 | 0 | 2 | 8 | 10 |
| | 4 | 1 | 5 | 2 | 2 | 6 | 0 | 1 | 9 | 10 |
| | 4 | 0 | 6 | 3 | 1 | 6 | 0 | 1 | 9 | 10 |
| | 3 | 0 | 7 | 2 | 2 | 6 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| 91,9 | 1 | 2 | 7 | 0 | 2 | 8 | 0 | 1 | 9 | 10 |
| | 4 | 6 | 0 | 0 | 4 | 6 | 0 | 1 | 9 | 10 |
| | 1 | 0 | 9 | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 4 | 0 | 6 | 2 | 0 | 8 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| | 3 | 0 | 7 | 0 | 3 | 7 | 0 | 2 | 8 | 10 |
| 107,0 | 5 | 0 | 5 | 2 | 1 | 7 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 3 | 1 | 6 | 0 | 3 | 7 | 0 | 1 | 9 | 10 |
| | 4 | 0 | 6 | 2 | 2 | 6 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| | 3 | 0 | 7 | 0 | 2 | 8 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 5 | 0 | 5 | 3 | 1 | 6 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| 122,5 | 7 | 0 | 3 | 2 | 3 | 5 | 0 | 1 | 9 | 10 |
| | 3 | 0 | 7 | 1 | 1 | 8 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| | 4 | 1 | 5 | 0 | 2 | 8 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 4 | 2 | 4 | 1 | 3 | 6 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| | 3 | 1 | 6 | 1 | 1 | 8 | 0 | 0 | 10 | 10 |

Tabla A III.23.
Promedios de supervivientes. Ensayo de NP9EO.

| mg/L NP9EO | 24 h | | 48 h | | 72 h | | Promedio DesvEst |
|------------|---------|------|---------|------|---------|------|---------------------|
| | + Total | ± | + Total | ± | + Total | ± | |
| 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 3,8 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 7,6 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 15,3 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 30,6 | 9,4 | 1,0 | 6,0 | 0,8 | 3,6 | 0,4 | Promedio DesvEst |
| | 0,89 | 1,41 | 2,35 | 0,84 | 1,34 | 0,55 | |
| 45,9 | 4,8 | 1,4 | 3,4 | 0,4 | 1,6 | 1,2 | Promedio DesvEst |
| | 2,28 | 0,89 | 1,67 | 0,55 | 0,55 | 0,84 | |
| 61,2 | 4,6 | 0,6 | 3,2 | 0,2 | 1,8 | 1,2 | Promedio DesvEst |
| | 1,14 | 0,55 | 1,30 | 0,45 | 0,84 | 0,84 | |
| 76,6 | 4,8 | 1,4 | 3,6 | 1,4 | 1,2 | 0,8 | Promedio DesvEst |
| | 1,30 | 1,67 | 0,89 | 0,55 | 0,45 | 0,84 | |
| 91,9 | 4,2 | 1,6 | 2,4 | 1,8 | 1,0 | 0,8 | Promedio DesvEst |
| | 3,42 | 2,61 | 1,14 | 1,79 | 0,71 | 0,84 | |
| 107,0 | 4,2 | 0,2 | 3,2 | 1,8 | 0,6 | 0,2 | Promedio DesvEst |
| | 0,84 | 0,45 | 0,84 | 0,84 | 0,55 | 0,45 | |
| 122,5 | 5,0 | 0,8 | 3,0 | 2,0 | 0,6 | 0,2 | Promedio DesvEst |
| | 1,58 | 0,84 | 1,41 | 1,00 | 0,55 | 0,45 | |

+ Total: Número total de supervivientes; ±: Número de organismos que presentan un descenso en la capacidad natatoria



Las concentraciones incluidas en la zona interior del gráfico muestran los valores de LC₅₀ obtenidos mediante el método de interpolación gráfica.

Tabla A III.24.
Resultados obtenidos mediante el método PROBIT

| Ensayo de 24 h | Concentración estimada de NP9EO (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|--|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 8,146 | 1,017 | 16,892 |
| LC/EC 5,00 | 15,818 | 3,724 | 26,836 |
| LC/EC 10,00 | 22,533 | 7,375 | 34,654 |
| LC/EC 15,00 | 28,611 | 11,607 | 41,496 |
| LC/EC 50,00 | 78,503 | 57,820 | 121,314 |
| LC/EC 85,00 | 215,401 | 134,247 | 760,919 |
| LC/EC 90,00 | 273,501 | 159,244 | 1208,900 |
| LC/EC 95,00 | 389,603 | 204,055 | 2412,528 |
| LC/EC 99,00 | 756,536 | 322,124 | 8891,970 |

χ^2 calculado=31,608; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados hay que interpretarlos con precaución

| Ensayo de 48 h | Concentración estimada de NP9EO (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|--|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 5,371 | 1,176 | 10,737 |
| LC/EC 5,00 | 10,370 | 3,395 | 17,518 |
| LC/EC 10,00 | 14,727 | 5,941 | 22,870 |
| LC/EC 15,00 | 18,661 | 8,631 | 27,494 |
| LC/EC 50,00 | 50,757 | 36,890 | 67,905 |
| LC/EC 85,00 | 138,060 | 96,767 | 273,274 |
| LC/EC 90,00 | 174,937 | 116,734 | 395,625 |
| LC/EC 95,00 | 248,436 | 152,853 | 690,221 |
| LC/EC 99,00 | 479,656 | 250,040 | 1986,938 |

χ^2 calculado=28,254; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados hay que interpretarlos con precaución

| Ensayo de 72 h | Concentración estimada de NP9EO (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|--|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 1,080 | 0,380 | 2,028 |
| LC/EC 5,00 | 2,105 | 0,927 | 3,489 |
| LC/EC 10,00 | 3,005 | 1,485 | 4,675 |
| LC/EC 15,00 | 3,820 | 2,036 | 5,710 |
| LC/EC 50,00 | 10,539 | 7,391 | 13,921 |
| LC/EC 85,00 | 29,078 | 22,034 | 41,324 |
| LC/EC 90,00 | 36,969 | 27,518 | 55,426 |
| LC/EC 95,00 | 52,764 | 37,684 | 86,915 |
| LC/EC 99,00 | 102,828 | 66,179 | 207,539 |

χ^2 calculado=16,317; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados hay que interpretarlos con precaución

4. ENSAYOS CON BACTERIAS LUMINISCENTES

4.1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Condiciones del ensayo LUMISTOX
- N° de réplicas: 2 para cada concentración y control
- Duración del ensayo: 30 minutos
- Respuesta observada: luminiscencia de las bacterias

ORGANISMOS DE ENSAYO

- Bacterias luminiscentes proporcionadas por la marca comercial *Dr. Lange* para el ensayo de LUMISTOX

RESULTADOS OBTENIDOS

- Inhibición de la luminiscencia a t=15 min, y t=30 min.

4.2. RESULTADOS OBTENIDOS

Tabla A III.25.

Resultados obtenidos en el ensayo de bacterias luminiscentes y NP9EO

| mg/L | Luminiscencia | | | t=15 min | | | t=30 min | | |
|-------|---------------|-------|------|----------|-------|----------|----------|-------|-------|
| | t=0 | t=15 | t=30 | Icorr | %H | Gamma | Icorr | %H | Gamma |
| 370,0 | 992,3 | 866,6 | 1060 | 1021,1 | 15,13 | 0,18 | 1111,2 | 4,60 | 0,05 |
| | 558,1 | 567,6 | 666 | 574,3 | 1,17 | 0,01 | 624,9 | -6,57 | -0,06 |
| 185,0 | 1335 | 1044 | 1242 | 1373,8 | 24,01 | 0,32 | 1494,9 | 16,92 | 0,20 |
| | 1328 | 1048 | 1220 | 1366,6 | 23,31 | 0,30 | 1487,1 | 17,96 | 0,22 |
| 92,5 | 1296 | 985,8 | 1151 | 1333,6 | 26,08 | 0,35 | 1451,2 | 20,69 | 0,26 |
| | 1322 | 1112 | 1320 | 1360,4 | 18,26 | 0,22 | 1480,3 | 10,83 | 0,12 |
| 46,3 | 1369 | 1114 | 1291 | 1408,8 | 20,92 | 0,26 | 1533,0 | 15,78 | 0,19 |
| | 1349 | 1143 | 1338 | 1388,2 | 17,66 | 0,21 | 1510,6 | 11,42 | 0,13 |
| 23,1 | 1473 | 1304 | 1408 | 1515,8 | 13,97 | 0,16 | 1649,4 | 14,64 | 0,17 |
| | 1258 | 1076 | 1215 | 1294,5 | 16,88 | 0,20 | 1408,7 | 13,75 | 0,16 |
| 11,6 | 1247 | 1269 | 1419 | 1283,2 | 1,11 | 0,01 | 1396,4 | -1,62 | -0,02 |
| | 1222 | 1273 | 1408 | 1257,5 | -1,23 | -0,01 | 1368,4 | -2,90 | -0,03 |
| 5,8 | 1340 | 1468 | 1614 | 1378,9 | -6,46 | -0,06 | 1500,5 | -7,56 | -0,07 |
| | 1301 | 1374 | 1516 | 1338,8 | -2,63 | -0,03 | 1456,8 | -4,06 | -0,04 |
| 0,0 | 1354 | 1390 | 1527 | 1393,3 | 0,24 | 0,00 | 1516,2 | -0,71 | -0,01 |
| | 1333 | 1375 | 1482 | 1371,7 | -0,24 | 0,00 | 1492,7 | 0,71 | 0,01 |
| | | | | | | KF=1,029 | KF=1,120 | | |

Tabla A II.26.

Promedio de los valores de %H del ensayo de NP9EO

| | mg/L NP9EO | | | | | | | | |
|----------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| | 0 | 5,8 | 11,6 | 23,1 | 46,3 | 92,5 | 185 | 370 | |
| t=15 min | 0,00 | 8,15 | 23,66 | 22,17 | 19,29 | 15,43 | -0,06 | -4,54 | Promedio |
| | 0,34 | 9,87 | 0,49 | 5,53 | 2,31 | 2,06 | 1,66 | 2,71 | DesvEst |
| t=30 min | 0,00 | -0,98 | 17,44 | 15,76 | 13,60 | 14,19 | -2,26 | -5,81 | Promedio |
| | 1,01 | 7,90 | 0,74 | 6,97 | 3,08 | 0,63 | 0,90 | 2,48 | DesvEst |

Variación del porcentaje de inhibición con la concentración de ensayo

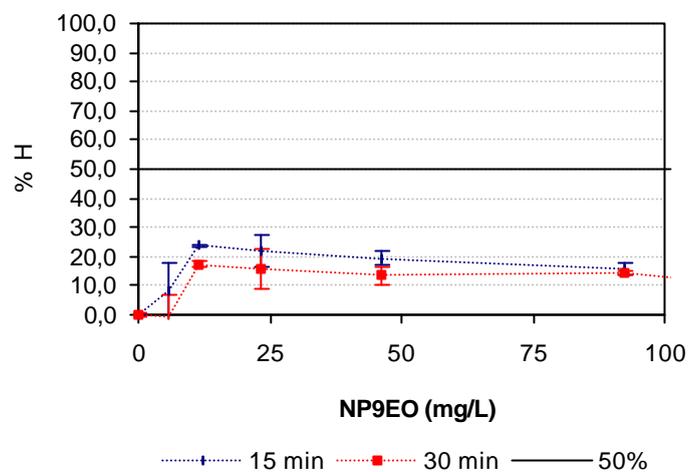


Tabla A III.27.
Valores de EC(p) calculados mediante interpolación gráfica

| NP9EO (mg/L) | $t=15 \text{ min}$ | $t=30 \text{ min}$ |
|------------------|--------------------|--------------------|
| EC ₅ | 17,9 | 19,1 |
| EC ₂₅ | --- | --- |
| EC ₅₀ | --- | --- |

5. OBJETIVOS DE CALIDAD DEL NP9EO. TABLAS DE CÁLCULO. RESULTADOS

Tabla A III.28. Tabla resumen de los resultados de toxicidad más sensibles (Fact. Seg.=100)

| Resumen de resultados más sensibles de cada grupo de organismos | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos del presente estudio | | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos de toxicidad en agua de mar | | | Valor mínimo obtenidos a partir de la base de datos de toxicidad acuática | | |
|---|---------------------------------|---|--------|---------|--|-------|---------|---|-------|---------|
| | | Nº datos | mg/L | x FS | Nº datos | mg/L | x FS | Nº datos | mg/L | x FS |
| Microalgas | NOEC (≤ 96 h) | 10 | 1,0 | 0,010 | 10 | 1,0 | 0,010 | 11 | 1,0 | 0,010 |
| | LOEC (≤ 96 h) | 10 | 2,0 | 0,020 | 10 | 2,0 | 0,020 | 10 | 2,0 | 0,020 |
| | IC ₅₀ (≤ 96 h) | 10 | 2,042 | 0,02042 | 10 | 2,042 | 0,02042 | 15 | 2,042 | 0,02042 |
| Crustáceos | EC ₅₀ (≤ 96 h) | 3 | 10,539 | 0,10539 | 7 | 0,9 | 0,009 | 7 | 0,9 | 0,009 |
| | EC ₅₀ (7 d) | | | | | | | 1 | 10 | 1 |
| Peces | NOEC (≤ 96 h) | | | | | | | 1 | 1 | 0,010 |
| | NOEC (7 d) | | | | | | | 1 | 1,8 | 0,180 |
| | EC50 (≤ 96 h) | | | | | | | 7 | 1,6 | 0,016 |

Tabla A III.29. Valores ecotoxicológicos obtenidos a partir de los valores L(E)C₅₀

| Valor guía obtenido a partir de los valores de L(E)C ₅₀ | Grupo de organismos | Tipo de Respuesta (Aguda o Crónica) | n _i , N | w _i = n _i /N | q _i = Conc·FS | w _i x q _i | Valor Guía = $\sum_{i=1}^n q_i w_i$ |
|--|---------------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Base de datos de toxicidad de este estudio | Algas | A | 10 | 0,7692 | 0,02042 | 0,0157 | 0,0400 mg/L NP9EO |
| | Crustáceos | A | 3 | 0,2308 | 0,10539 | 0,0243 | |
| | N total de datos | | 13 | | | | |
| Base de datos de toxicidad en agua de mar | Algas | A | 10 | 0,5882 | 0,02042 | 0,0120 | 0,0157 mg/L NP9EO |
| | Crustáceos | A | 7 | 0,4118 | 0,0090 | 0,0037 | |
| | N total de datos | | 17 | | | | |
| Base de toxicidad acuática | Algas | A | 15 | 0,5000 | 0,0204 | 0,0102 | 0,0494 mg/L NP9EO |
| | Crustáceos | A | 7 | 0,2333 | 0,0090 | 0,0021 | |
| | Crustáceos | C | 1 | 0,0333 | 1 | 0,0333 | |
| | Peces | A | 7 | 0,2333 | 0,0160 | 0,0037 | |
| | N total de datos | | 30 | | | | |

Tabla A III.30. Valores ecotoxicológicos obtenidos a partir de los valores NOEC/LOEC

| Valor guía obtenido a partir de los valores NOEC/LOEC | Grupo de organismos | Tipo de Respuesta (Aguda o Crónica) | n _i , N | w _i = n _i /N | q _i = Conc·FS | w _i x q _i | Valor Guía = $\sum_{i=1}^n q_i w_i$ |
|---|---------------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Base de datos de toxicidad de este estudio | Algas | A (NOEC) | 10 | 0,5000 | 0,01 | 0,0050 | 0,0150 mg/L NP9EO |
| | Algas | A (LOEC) | 10 | 0,5000 | 0,02 | 0,0100 | |
| | N total de datos | | 20 | | | | |
| Base de datos de toxicidad en agua de mar | Algas | A (NOEC) | 10 | 0,5000 | 0,0100 | 0,0050 | 0,0150 mg/L NP9EO |
| | Algas | A (LOEC) | 10 | 0,5000 | 0,02 | 0,0100 | |
| | N total de datos | | 20 | | | | |
| Base de toxicidad acuática | Algas | A (NOEC) | 11 | 0,4783 | 0,0100 | 0,0048 | 0,0217 mg/L NP9EO |
| | Algas | A (LOEC) | 10 | 0 | 0,0200 | 0,0087 | |
| | Peces | A (NOEC) | 1 | 0,0435 | 0,01 | 0,0004 | |
| | Peces | C (NOEC) | 1 | 0,0435 | 0,18 | 0,0078 | |
| | N total de datos | | 23 | | | | |

ANEXO IV. FENOL

1. DATOS DE REFERENCIA

1.1. PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS

- Nombre del producto: fenol
- Nombre común: ácido carbólico
- Sinónimos: ácido fenólico, fenil-hidróxido
- Número del producto: 108-95-2
- Fórmula empírica: C_6H_6O
- Fórmula estructural:



- Peso molecular: 94,11 g/mol
- Punto de fusión: 41,0°C
- Punto de ebullición: 182,0 °C
- Utilizado como desinfectante, fabricación de resinas, tintes, compuestos médicos, gran uso industrial, etc.

1.2. DATOS DE TOXICIDAD DE REFERENCIA

La siguiente tabla muestra algunos resultados de toxicidad obtenidos de la bibliografía:

Tabla A IV.1a.
Datos de toxicidad del Fenol en algunos grupos de organismos. Algas

| Especies | Medio | Tiempo Exposición (h) | Expresión de toxicidad | Fenol (mg/L) | Referencia |
|--------------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|--------------|-----------------------------------|
| <i>Microcystis aeruginosa</i> | Agua dulce | crónica | TL | 4,6 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Scenedesmus quadricauda</i> | Agua dulce | crónica | TL | 7,5 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Microcystis aeruginosa</i> | agua salada | 8 | NOEC | 0,500 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Microcystis aeruginosa</i> | agua salada | 8 | LOEC | 5,000 | ECETOC ⁽¹⁾ |

Tabla A IV.1b.
Datos de toxicidad del Fenol en algunos grupos de organismos. Crustáceos

| Especies | Medio | Tiempo Exposición (h) | Expresión de toxicidad | Fenol (mg/L) | Referencia |
|------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|--------------|-----------------------------------|
| <i>Daphnia</i> | Agua dulce | 50 | TLm | 7 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia</i> | Agua dulce | crónica | LD0 | 16 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia</i> | Agua dulce | 50 | TLm | 21 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Artemia salina</i> | Agua salada | 50 | TLm | 56 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Crangon crangon</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 25 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |

Tabla A IV.1c.
Datos de toxicidad del Fenol en algunos grupos de organismos. Otros invertebrados

| Especies | Medio | Tiempo Exposición (h) | Expresión de toxicidad | Fenol (mg/L) | Referencia |
|------------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|--------------|-----------------------------------|
| <i>Crassostrea virginica</i> | Agua salada | 48 | TLm | 58,25 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Mercenaria mercenaria</i> | Agua salada | 12 d | TLm | 55 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Mercenaria mercenaria</i> | Agua salada | 48 | TLm | 52,63 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |

Tabla A IV.1d.
Datos de toxicidad del Fenol en algunos grupos de organismos. Peces

| <i>Especies</i> | <i>Medio</i> | <i>Tiempo Exposición (h)</i> | <i>Expresión de toxicidad</i> | <i>Fenol (mg/L)</i> | <i>Referencia</i> |
|--------------------------------|--------------|------------------------------|-------------------------------|---------------------|-----------------------------------|
| <i>Arctopsyche grandis</i> | Agua dulce | 96 | TLM | 0,001 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Brachydanio rerio</i> | Agua dulce | 10 d | EC50 | 39 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 11,5 d | EC50 | 0,08 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 2,5 d | EC50 | 0,08 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 7,5 d | EC50 | 0,45 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 11,5 d | EC50 | 0,64 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 0,71 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 7,5 d | EC50 | 1,19 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 2,5 d | EC50 | 1,33 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 48 | EC100 | 28,9 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 48 | TLM | 44,5 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 96 | TLM | 44,5 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 46 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius auratus</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 60 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Carassius carassius</i> | Agua dulce | 24 | TLM | 25 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Gobius minutus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 9 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Jordanella floridae</i> | Agua dulce | 10 d | EC50 | 36,3 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Lebistes reticulatus</i> | Agua dulce | 96 | TLM | 29,2 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Lebistes reticulatus</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 30 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Lepomis macrochirus</i> | Agua dulce | 96 | TLM | 5,7 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Lepomis macrochirus</i> | Agua dulce | 50 | TLM | 10 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Lepomis macrochirus</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 19 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Lepomis macrochirus</i> | Agua dulce | 96 | TLM | 23,9 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Mollienesia latipinna</i> | Agua dulce | 50 | TLM | 22 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Notemigonus crysoleucas</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 35 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Agua dulce | 3 | EC100 | 5 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Agua dulce | 24 | TLM | 5 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Agua dulce | 10 d | EC50 | 5,6 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Opheocephalus punctatus</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 46 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Perca fluviatilis</i> | Agua dulce | 1 | EC100 | 9 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 8,3 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 8 d | EC50 | 22 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 28 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 30 d | NOEC | 0,75 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 28 | NOEC | 1,8 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 30 d | LOEC | 2,5 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 28 | LOEC | 3,6 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 5,02 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 96 | TLM | 24 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 24,9 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 30 d | EC50 | 46 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Rutilus rutilus</i> | Agua dulce | 6 | EC50 | 10 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Rutilus rutilus</i> | Agua dulce | 24 | TLM | 15 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 30 d | EC50 | 0,33 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 30 d | EC50 | 0,52 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 26 d | EC50 | 0,54 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 22 d | EC50 | 0,56 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 22 d | EC50 | 2,45 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 8,9 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Semotilus atromaculatus</i> | Agua dulce | crónica d | EC0 | 10 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Semotilus atromaculatus</i> | Agua dulce | crónica d | EC100 | 20 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Tinca tinca</i> | Agua dulce | 24 | TLM | 17 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |

¹ Referencias recogidas en los documentos indicados pero no pertenecientes a estos autores

2. ENSAYOS DE MICROALGAS MARINAS

RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Volumen de los viales de ensayo: 15 mL
- Volumen de solución de ensayo: 4 mL
- Agua de dilución: agua de mar sintética
- Medio nutriente adicional: si, medio f/2
- Temperatura de ensayo: $20 \pm 0,1$ °C
- Iluminación: constante, 11000 lux
- Aireación: diaria -de forma manual-
- Duración del ensayo: 10 días (+ 10 para el estudio de la concentración alguistática y alguicida)
- Medidas de biomasa: turbidez, a $\lambda = 690$ nm

MICROALGAS ENSAYADAS

- *Nannochloropsis gaditana*
- *Isochrysis galbana*
- *Dunaliella salina*
- *Chaetoceros gracilis*
- *Tetraselmis chuii*

RESULTADOS OBTENIDOS

- Valores de biomasa (Abs, 690 nm) de cada tratamiento
- Valores experimentales de NOEC y LOEC
- Valores experimentales de inhibición calculados a partir del ICp programa (Las indicaciones inferiores de las tablas (*) y (**)) están referidas a indicaciones realizadas por el programa
- Concentraciones alguistáticas y alguicidas experimentales

2.1. *Nannochloropsis gaditana*

Tabla A IV.2.

Evolución de la biomasa de *Nannochloropsis gaditana*. Ensayo de FENOL.

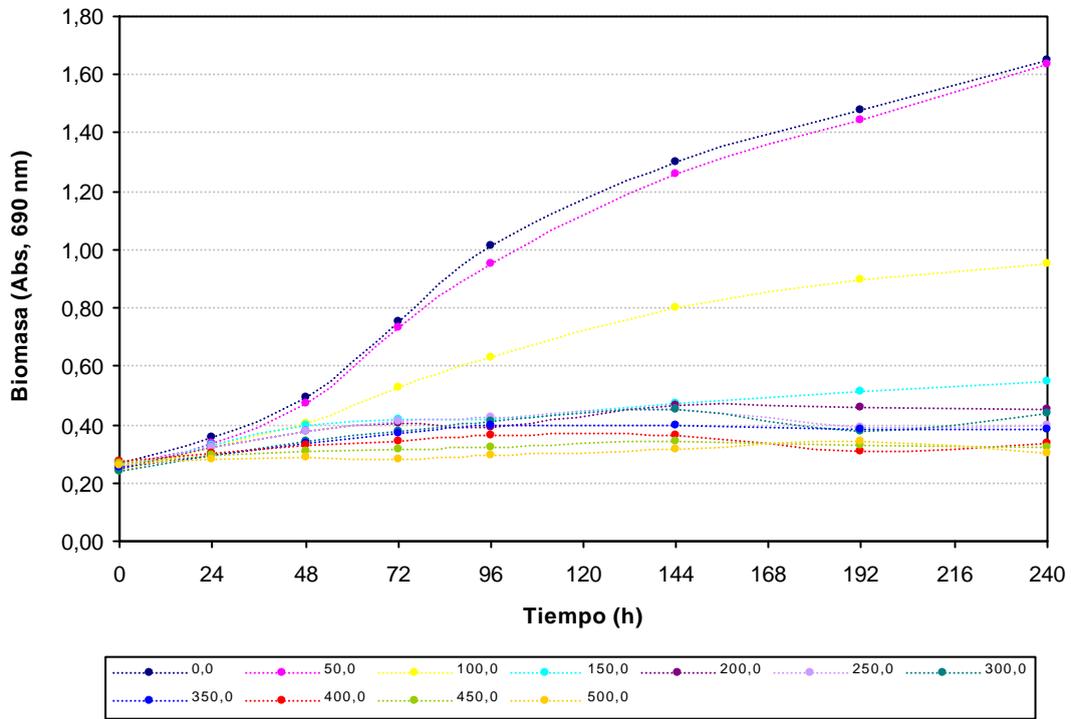
| | | <i>N. gaditana</i>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | |
|-------|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| t(d) | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| t(h) | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| 0 | | 0,281 | 0,387 | 0,523 | 0,803 | 1,053 | | | | 0,000 | 0,106 | 0,242 | 0,522 | 0,772 | | | |
| | | 0,248 | 0,336 | 0,478 | 0,735 | 0,998 | 1,297 | 1,478 | 1,649 | 0,000 | 0,088 | 0,230 | 0,487 | 0,750 | 1,049 | 1,230 | 1,401 |
| | | 0,265 | 0,336 | 0,480 | 0,730 | 0,992 | | | | 0,000 | 0,071 | 0,215 | 0,465 | 0,727 | | | |
| 50,0 | | 0,239 | 0,337 | 0,478 | 0,759 | 0,971 | | | | 0,000 | 0,098 | 0,239 | 0,520 | 0,732 | | | |
| | | 0,257 | 0,342 | 0,479 | 0,722 | 0,956 | 1,261 | 1,444 | 1,635 | 0,000 | 0,085 | 0,222 | 0,465 | 0,699 | 1,004 | 1,187 | 1,378 |
| | | 0,255 | 0,327 | 0,464 | 0,706 | 0,935 | | | | 0,000 | 0,072 | 0,209 | 0,451 | 0,680 | | | |
| 100,0 | | 0,242 | 0,344 | 0,420 | 0,539 | 0,661 | | | | 0,000 | 0,102 | 0,178 | 0,297 | 0,419 | | | |
| | | 0,245 | 0,319 | 0,405 | 0,528 | 0,643 | 0,800 | 0,899 | 0,948 | 0,000 | 0,074 | 0,160 | 0,283 | 0,398 | 0,555 | 0,654 | 0,703 |
| | | 0,239 | 0,304 | 0,388 | 0,504 | 0,595 | | | | 0,000 | 0,065 | 0,149 | 0,265 | 0,356 | | | |
| 150,0 | | 0,249 | 0,339 | 0,401 | 0,418 | 0,422 | | | | 0,000 | 0,090 | 0,152 | 0,169 | 0,173 | | | |
| | | 0,268 | 0,342 | 0,413 | 0,438 | 0,430 | 0,470 | 0,515 | 0,545 | 0,000 | 0,074 | 0,145 | 0,170 | 0,162 | 0,202 | 0,247 | 0,277 |
| | | 0,252 | 0,314 | 0,386 | 0,404 | 0,410 | | | | 0,000 | 0,062 | 0,134 | 0,152 | 0,158 | | | |
| 200,0 | | 0,256 | 0,337 | 0,402 | 0,414 | 0,390 | | | | 0,000 | 0,081 | 0,146 | 0,158 | 0,134 | | | |
| | | 0,243 | 0,316 | 0,375 | 0,410 | 0,396 | 0,463 | 0,456 | 0,451 | 0,000 | 0,073 | 0,132 | 0,167 | 0,153 | 0,220 | 0,213 | 0,208 |
| | | 0,242 | 0,304 | 0,359 | 0,396 | 0,392 | | | | 0,000 | 0,062 | 0,117 | 0,154 | 0,150 | | | |
| 250,0 | | 0,270 | 0,341 | 0,397 | 0,424 | 0,432 | | | | 0,000 | 0,071 | 0,127 | 0,154 | 0,162 | | | |
| | | 0,245 | 0,308 | 0,370 | 0,406 | 0,417 | 0,453 | 0,390 | 0,398 | 0,000 | 0,063 | 0,125 | 0,161 | 0,172 | 0,208 | 0,145 | 0,153 |
| | | 0,274 | 0,314 | 0,372 | 0,408 | 0,431 | | | | 0,000 | 0,040 | 0,098 | 0,134 | 0,157 | | | |
| 300,0 | | 0,246 | 0,295 | 0,350 | 0,380 | 0,413 | | | | 0,000 | 0,049 | 0,104 | 0,134 | 0,167 | | | |
| | | 0,242 | 0,304 | 0,347 | 0,385 | 0,413 | 0,450 | 0,378 | 0,435 | 0,000 | 0,062 | 0,105 | 0,143 | 0,171 | 0,208 | 0,136 | 0,193 |
| | | 0,240 | 0,284 | 0,333 | 0,374 | 0,406 | | | | 0,000 | 0,044 | 0,093 | 0,134 | 0,166 | | | |
| 350,0 | | 0,249 | 0,296 | 0,338 | 0,362 | 0,407 | | | | 0,000 | 0,047 | 0,089 | 0,113 | 0,158 | | | |
| | | 0,268 | 0,310 | 0,353 | 0,375 | 0,397 | 0,398 | 0,385 | 0,386 | 0,000 | 0,042 | 0,085 | 0,107 | 0,129 | 0,130 | 0,117 | 0,118 |
| | | 0,247 | 0,286 | 0,315 | 0,365 | 0,378 | | | | 0,000 | 0,039 | 0,068 | 0,118 | 0,131 | | | |
| 400,0 | | 0,248 | 0,291 | 0,325 | 0,336 | 0,356 | | | | 0,000 | 0,043 | 0,077 | 0,088 | 0,108 | | | |
| | | 0,283 | 0,312 | 0,338 | 0,351 | 0,366 | 0,360 | 0,306 | 0,335 | 0,000 | 0,029 | 0,055 | 0,068 | 0,083 | 0,077 | 0,023 | 0,052 |
| | | 0,282 | 0,310 | 0,330 | 0,345 | 0,360 | | | | 0,000 | 0,028 | 0,048 | 0,063 | 0,078 | | | |
| 450,0 | | 0,259 | 0,290 | 0,300 | 0,306 | 0,315 | | | | 0,000 | 0,031 | 0,041 | 0,047 | 0,056 | | | |
| | | 0,269 | 0,297 | 0,307 | 0,317 | 0,322 | 0,341 | 0,329 | 0,322 | 0,000 | 0,028 | 0,038 | 0,048 | 0,053 | 0,072 | 0,060 | 0,053 |
| | | 0,279 | 0,298 | 0,310 | 0,316 | 0,324 | | | | 0,000 | 0,019 | 0,031 | 0,037 | 0,045 | | | |
| 500,0 | | 0,268 | 0,288 | 0,295 | 0,297 | 0,305 | | | | 0,000 | 0,020 | 0,027 | 0,029 | 0,037 | | | |
| | | 0,252 | 0,288 | 0,274 | 0,266 | 0,283 | 0,318 | 0,340 | 0,298 | 0,000 | 0,036 | 0,022 | 0,014 | 0,031 | 0,066 | 0,088 | 0,046 |
| | | 0,252 | 0,275 | 0,288 | 0,277 | 0,291 | | | | 0,000 | 0,023 | 0,036 | 0,025 | 0,039 | | | |

Tabla A IV.3.

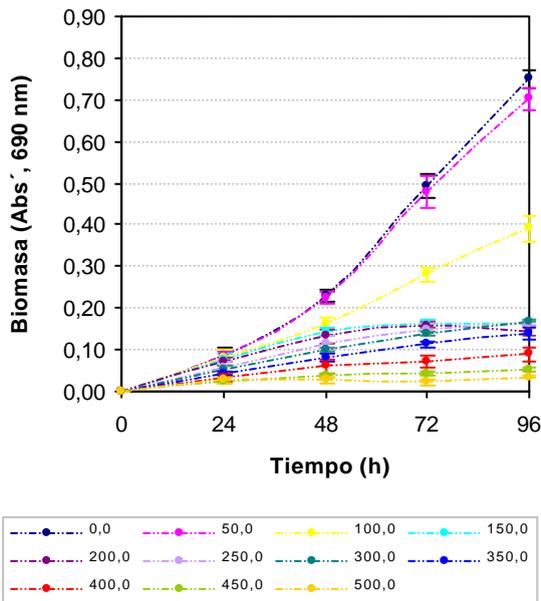
Variación de la biomasa algal a lo largo de las concentraciones de ensayo

| t (h) | mg/L C ₆ H ₅ OH | | | | | | | | | | | Promedio | DesvEst |
|-------|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|---------|
| | 0,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 300,0 | 350,0 | 400,0 | 450,0 | 500,0 | | |
| 24 | 0,088 | 0,085 | 0,080 | 0,075 | 0,072 | 0,058 | 0,052 | 0,043 | 0,033 | 0,026 | 0,026 | Promedio | DesvEst |
| | 0,018 | 0,013 | 0,019 | 0,014 | 0,010 | 0,016 | 0,009 | 0,004 | 0,008 | 0,006 | 0,009 | | |
| 48 | 0,229 | 0,223 | 0,162 | 0,144 | 0,132 | 0,117 | 0,101 | 0,081 | 0,060 | 0,037 | 0,028 | Promedio | DesvEst |
| | 0,014 | 0,015 | 0,015 | 0,009 | 0,015 | 0,016 | 0,007 | 0,011 | 0,015 | 0,005 | 0,007 | | |
| 72 | 0,491 | 0,479 | 0,282 | 0,164 | 0,160 | 0,150 | 0,137 | 0,113 | 0,073 | 0,044 | 0,023 | Promedio | DesvEst |
| | 0,029 | 0,036 | 0,016 | 0,010 | 0,007 | 0,014 | 0,005 | 0,006 | 0,013 | 0,006 | 0,008 | | |
| 96 | 0,750 | 0,704 | 0,391 | 0,164 | 0,146 | 0,164 | 0,168 | 0,139 | 0,090 | 0,051 | 0,036 | Promedio | DesvEst |
| | 0,023 | 0,026 | 0,032 | 0,008 | 0,010 | 0,008 | 0,003 | 0,016 | 0,016 | 0,006 | 0,004 | | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

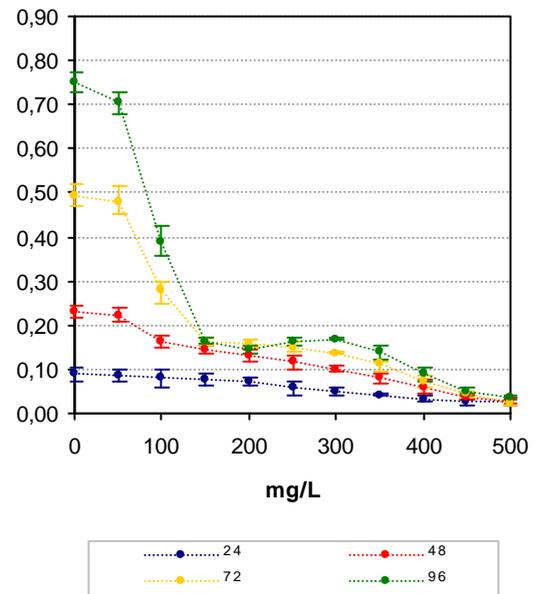


Tabla A IV.4.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *N. gaditana* expuesta a diferentes concentraciones de FENOL.

| <i>N. gaditana</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,976 | | 0,955 | | 0,949 | | 0,963 | |
| B calculado | 6,32 | | 4,35 | | 15,67 | | 16,72 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L Fenol | t _i | p |
| 50,0 | 0,33 | 0,40212 | 0,57 | 0,32648 | 0,93 | 0,33062 | 3,40 (*) | 0,04141 |
| 100,0 | 0,79 | 0,31149 | 6,66 (*) | 0,00221 | 15,33 (*) | 0,00019 | 26,48 | 0,00005 |
| 150,0 | 1,29 | 0,18624 | 8,53 | 0,00041 | 23,96 | 0,00002 | 43,21 | 0,00000 |
| 200,0 | 1,62 | 0,11442 | 9,72 | 0,00053 | 24,25 | 0,00002 | 44,59 | 0,00000 |
| 250,0 | 3,01 (*) | 0,04583 | 11,22 | 0,00038 | 24,98 | 0,00003 | 43,26 | 0,00000 |
| 300,0 | 3,63 | 0,01637 | 12,82 | 0,00006 | 25,91 | 0,00002 | 42,94 | 0,00000 |
| 350,0 | 4,53 | 0,00583 | 14,82 | 0,00006 | 27,69 | 0,00001 | 45,05 | 0,00000 |
| 400,0 | 5,45 | 0,00400 | 16,88 | 0,00007 | 30,59 | 0,00001 | 48,72 | 0,00000 |
| 450,0 | 6,18 | 0,00218 | 19,22 | 0,00001 | 32,71 | 0,00001 | 51,55 | 0,00000 |
| 500,0 | 6,15 | 0,00263 | 20,05 | 0,00001 | 34,27 | 0,00001 | 52,71 | 0,00000 |
| MSD | 0,027 | | 0,026 | | 0,036 | | 0,036 | |
| % reducción | 30,15 | | 11,54 | | 7,35 | | 4,77 | |
| <p><i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola).</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| <i>t=72 h</i> | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,961 | | 0,954 | | 0,946 | | 0,956 | | 0,951 | | 0,949 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 6,08 | | 9,15 | | 11,85 | | 12,21 | | 14,35 | | 15,67 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L Fenol | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 50,0 | 0,72 | 0,33 | 0,78 | 0,33 | 0,83 | 0,33 | 0,85 | 0,33 | 0,89 | 0,33 | 0,93 | 0,33 |
| 100,0 | 11,98(*) | 0,00 | 12,88(*) | 0,00 | 13,69(*) | 0,00 | 14,09(*) | 0,00 | 14,76(*) | 0,00 | 15,33(*) | 0,00 |
| 150,0 | 18,72 | 0,00 | 20,12 | 0,00 | 21,40 | 0,00 | 22,02 | 0,00 | 23,07 | 0,00 | 23,96 | 0,00 |
| 200,0 | 18,95 | 0,00 | 20,37 | 0,00 | 21,66 | 0,00 | 22,29 | 0,00 | 23,35 | 0,00 | 24,25 | 0,00 |
| 250,0 | 19,52 | 0,00 | 20,98 | 0,00 | 22,31 | 0,00 | 22,96 | 0,00 | 24,05 | 0,00 | 24,98 | 0,00 |
| 300,0 | --- | --- | 21,76 | 0,00 | 23,14 | 0,00 | 23,81 | 0,00 | 24,95 | 0,00 | 25,91 | 0,00 |
| 350,0 | --- | --- | --- | --- | 24,73 | 0,00 | 25,45 | 0,00 | 26,66 | 0,00 | 27,69 | 0,00 |
| 400,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 28,11 | 0,00 | 29,45 | 0,00 | 30,59 | 0,00 |
| 450,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 31,49 | 0,00 | 32,71 | 0,00 |
| 500,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 34,27 | 0,00 |
| MSD | 0,044 | | 0,041 | | 0,039 | | 0,038 | | 0,037 | | 0,036 | |
| % reducción | 8,91 | | 8,38 | | 7,98 | | 7,81 | | 7,52 | | 7,35 | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | | | | | |

Tabla A IV.5

Valores de ICp del ensayo de *N. gaditana* y FENOL a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de FENOL estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expan. Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 53,0203 | -4,7373 | 25,5167 | 48,5600 | 56,2841 | 59,8744 | 9,8299 |
| | 25 | 77,9611 | 62,2688 | 70,4886 | 77,2274 | 81,8172 | 86,0589 | 2,9439 |
| | 50 | 115,2542 | 98,7095 | 107,3758 | 114,6492 | 120,8214 | 126,9453 | 3,4652 |
| | 75 | 329,1096 | 294,9295 | 312,8333 | 328,0131 | 343,2812 | 358,8701 | 7,7365 |
| | 95 | 495,5469 | (*) | (*) | 491,9645 | (*) | (*) | 4,9957 |
| 96 | 5 | 40,7428 | 6,5968 | 24,4828 | 40,8119 | 53,9272 | 68,4300 | 9,1069 |
| | 25 | 72,6146 | 64,0831 | 68,5520 | 72,5899 | 76,5777 | 80,9370 | 2,0757 |
| | 50 | 103,5662 | 91,2161 | 97,6852 | 103,3810 | 108,8391 | 114,6392 | 3,0348 |
| | 75 | 144,9081 | 140,9011 | 143,0000 | 144,9154 | 146,8274 | 148,9387 | 0,9923 |
| | 95 | 494,2021 | (*) | (*) | 492,1152 | (*) | (*) | 4,3652 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

(*) No es posible realizar la interpolación lineal del conjunto de datos para este porcentaje de respuesta

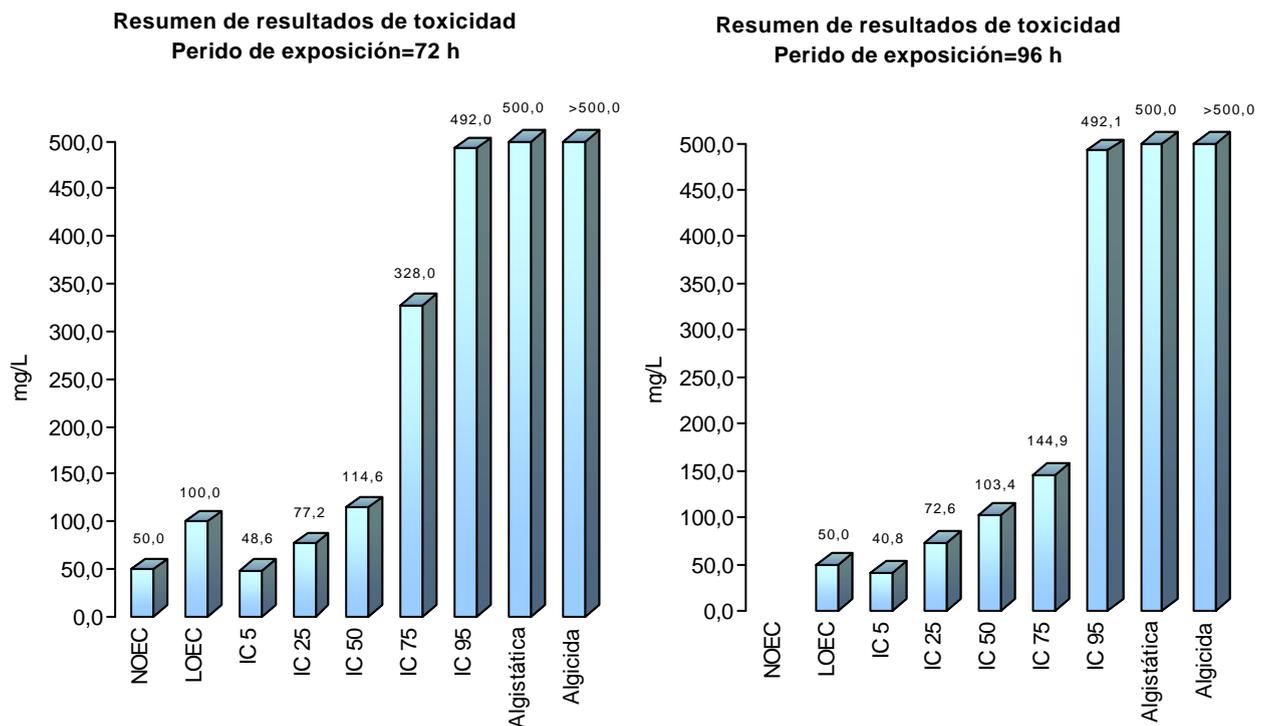
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de *fenol* ensayadas con *N. gaditana* (350, 400, 450 y 500 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa en todos los viales.

- Concentración alguistática= 500 mg/L
- Concentración alguicida= No determinado experimentalmente

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de *fenol* y *N. gaditana*



2.2. Isochrysis galbana

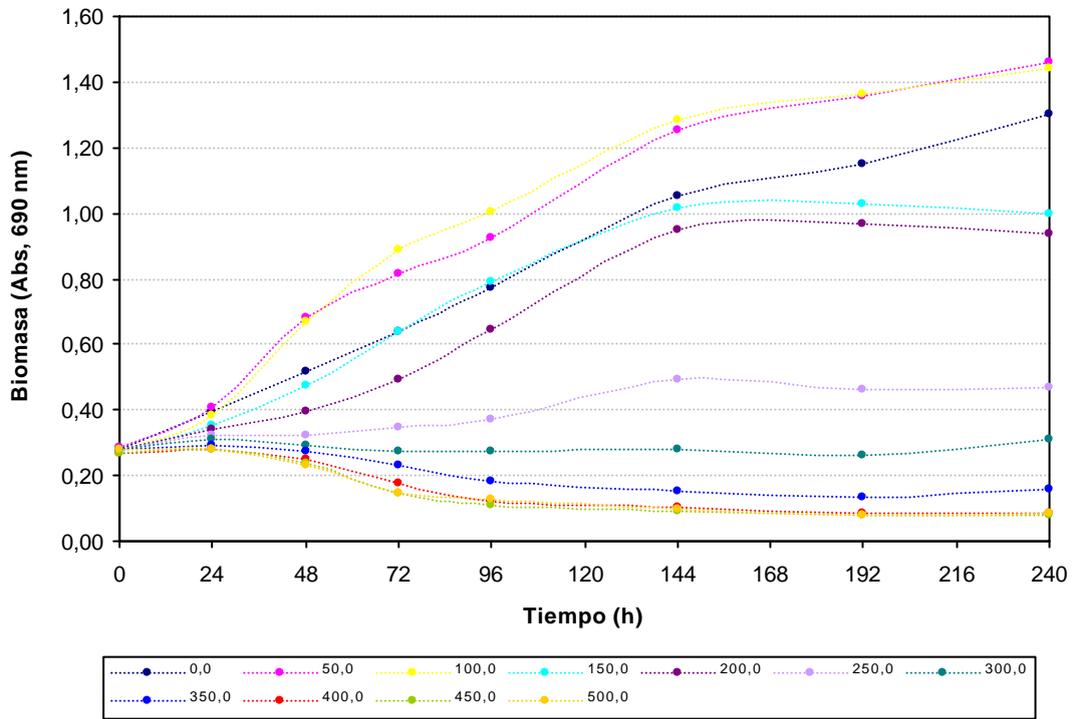
Tabla A IV.6.
Evolución de la biomasa de Isochrysis galbana. Ensayo de FENOL.

| t(d) | I. galbana. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | |
|-------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| | t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 |
| 0 | 0,290 | 0,420 | 0,539 | 0,660 | 0,796 | | | | 0,000 | 0,130 | 0,249 | 0,370 | 0,506 | | | |
| | 0,263 | 0,386 | 0,503 | 0,614 | 0,739 | 1,054 | 1,149 | 1,302 | 0,000 | 0,123 | 0,240 | 0,351 | 0,476 | 0,791 | 0,886 | 1,039 |
| | 0,286 | 0,387 | 0,517 | 0,649 | 0,783 | | | | 0,000 | 0,101 | 0,231 | 0,363 | 0,497 | | | |
| 50,0 | 0,294 | 0,431 | 0,720 | 0,831 | 0,938 | | | | 0,000 | 0,137 | 0,426 | 0,537 | 0,644 | | | |
| | 0,294 | 0,414 | 0,700 | 0,843 | 0,954 | 1,256 | 1,356 | 1,459 | 0,000 | 0,120 | 0,406 | 0,549 | 0,660 | 0,962 | 1,062 | 1,165 |
| | 0,275 | 0,375 | 0,627 | 0,775 | 0,881 | | | | 0,000 | 0,100 | 0,352 | 0,500 | 0,606 | | | |
| 100,0 | 0,264 | 0,384 | 0,744 | 0,930 | 1,033 | | | | 0,000 | 0,120 | 0,480 | 0,666 | 0,769 | | | |
| | 0,284 | 0,386 | 0,660 | 0,902 | 1,015 | 1,286 | 1,360 | 1,440 | 0,000 | 0,102 | 0,376 | 0,618 | 0,731 | 1,002 | 1,076 | 1,156 |
| | 0,281 | 0,371 | 0,596 | 0,837 | 0,959 | | | | 0,000 | 0,090 | 0,315 | 0,556 | 0,678 | | | |
| 150,0 | 0,251 | 0,344 | 0,487 | 0,635 | 0,756 | | | | 0,000 | 0,093 | 0,236 | 0,384 | 0,505 | | | |
| | 0,288 | 0,362 | 0,482 | 0,647 | 0,796 | 1,015 | 1,028 | 1,000 | 0,000 | 0,074 | 0,194 | 0,359 | 0,508 | 0,727 | 0,740 | 0,712 |
| | 0,281 | 0,346 | 0,457 | 0,634 | 0,814 | | | | 0,000 | 0,065 | 0,176 | 0,353 | 0,533 | | | |
| 200,0 | 0,271 | 0,331 | 0,391 | 0,520 | 0,675 | | | | 0,000 | 0,060 | 0,120 | 0,249 | 0,404 | | | |
| | 0,288 | 0,346 | 0,404 | 0,496 | 0,646 | 0,950 | 0,967 | 0,937 | 0,000 | 0,058 | 0,116 | 0,208 | 0,358 | 0,662 | 0,679 | 0,649 |
| | 0,284 | 0,336 | 0,388 | 0,463 | 0,613 | | | | 0,000 | 0,052 | 0,104 | 0,179 | 0,329 | | | |
| 250,0 | 0,267 | 0,313 | 0,308 | 0,330 | 0,352 | | | | 0,000 | 0,046 | 0,041 | 0,063 | 0,085 | | | |
| | 0,274 | 0,317 | 0,317 | 0,341 | 0,393 | 0,493 | 0,460 | 0,471 | 0,000 | 0,043 | 0,043 | 0,067 | 0,119 | 0,219 | 0,186 | 0,197 |
| | 0,298 | 0,337 | 0,344 | 0,364 | 0,372 | | | | 0,000 | 0,039 | 0,046 | 0,066 | 0,074 | | | |
| 300,0 | 0,272 | 0,308 | 0,283 | 0,265 | 0,261 | | | | 0,000 | 0,036 | 0,011 | -0,007 | -0,011 | | | |
| | 0,268 | 0,295 | 0,284 | 0,263 | 0,260 | 0,282 | 0,262 | 0,310 | 0,000 | 0,027 | 0,016 | -0,005 | -0,008 | 0,014 | -0,006 | 0,042 |
| | 0,292 | 0,320 | 0,316 | 0,295 | 0,302 | | | | 0,000 | 0,028 | 0,024 | 0,003 | 0,010 | | | |
| 350,0 | 0,288 | 0,300 | 0,281 | 0,231 | 0,167 | | | | 0,000 | 0,012 | -0,007 | -0,057 | -0,121 | | | |
| | 0,287 | 0,308 | 0,282 | 0,240 | 0,193 | 0,152 | 0,131 | 0,159 | 0,000 | 0,021 | -0,005 | -0,047 | -0,094 | -0,135 | -0,156 | -0,128 |
| | 0,262 | 0,275 | 0,259 | 0,226 | 0,182 | | | | 0,000 | 0,013 | -0,003 | -0,036 | -0,080 | | | |
| 400,0 | 0,259 | 0,267 | 0,232 | 0,141 | 0,093 | | | | 0,000 | 0,008 | -0,027 | -0,118 | -0,166 | | | |
| | 0,286 | 0,293 | 0,268 | 0,194 | 0,137 | 0,102 | 0,085 | 0,088 | 0,000 | 0,007 | -0,018 | -0,092 | -0,149 | -0,184 | -0,201 | -0,198 |
| | 0,261 | 0,274 | 0,249 | 0,189 | 0,132 | | | | 0,000 | 0,013 | -0,012 | -0,072 | -0,129 | | | |
| 450,0 | 0,267 | 0,275 | 0,225 | 0,124 | 0,096 | | | | 0,000 | 0,008 | -0,042 | -0,143 | -0,171 | | | |
| | 0,271 | 0,275 | 0,242 | 0,151 | 0,116 | 0,091 | 0,077 | 0,078 | 0,000 | 0,004 | -0,029 | -0,120 | -0,155 | -0,180 | -0,194 | -0,193 |
| | 0,272 | 0,285 | 0,252 | 0,171 | 0,122 | | | | 0,000 | 0,013 | -0,020 | -0,101 | -0,150 | | | |
| 500,0 | 0,275 | 0,277 | 0,231 | 0,147 | 0,121 | | | | 0,000 | 0,002 | -0,044 | -0,128 | -0,154 | | | |
| | 0,280 | 0,276 | 0,229 | 0,136 | 0,121 | 0,096 | 0,080 | 0,083 | 0,000 | -0,004 | -0,051 | -0,144 | -0,159 | -0,184 | -0,200 | -0,197 |
| | 0,286 | 0,282 | 0,239 | 0,157 | 0,133 | | | | 0,000 | -0,004 | -0,047 | -0,129 | -0,153 | | | |

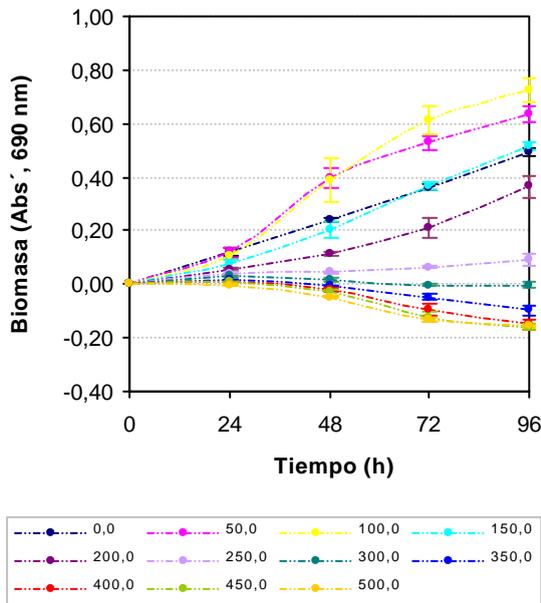
Tabla A IV.7.
Variación de la biomasa algal a lo largo de las concentraciones de ensayo

| t (h) | mg/L C ₆ H ₅ OH | | | | | | | | | | | Promedio | DesvEst |
|-------|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|---------|
| | 0,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 300,0 | 350,0 | 400,0 | 450,0 | 500,0 | | |
| 24 | 0,118 | 0,119 | 0,106 | 0,077 | 0,057 | 0,039 | 0,030 | 0,015 | 0,009 | 0,008 | -0,002 | | |
| | 0,015 | 0,019 | 0,019 | 0,014 | 0,004 | 0,000 | 0,005 | 0,005 | 0,003 | 0,005 | 0,003 | | |
| 48 | 0,240 | 0,395 | 0,390 | 0,202 | 0,113 | 0,043 | 0,017 | -0,005 | -0,019 | -0,030 | -0,047 | | |
| | 0,009 | 0,038 | 0,083 | 0,031 | 0,008 | 0,003 | 0,007 | 0,002 | 0,008 | 0,011 | 0,004 | | |
| 72 | 0,361 | 0,529 | 0,613 | 0,365 | 0,212 | 0,065 | -0,003 | -0,047 | -0,094 | -0,121 | -0,134 | | |
| | 0,010 | 0,026 | 0,055 | 0,016 | 0,035 | 0,002 | 0,005 | 0,011 | 0,023 | 0,021 | 0,009 | | |
| 96 | 0,493 | 0,637 | 0,726 | 0,515 | 0,364 | 0,093 | -0,003 | -0,098 | -0,148 | -0,159 | -0,155 | | |
| | 0,015 | 0,028 | 0,046 | 0,015 | 0,038 | 0,023 | 0,011 | 0,021 | 0,019 | 0,011 | 0,003 | | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

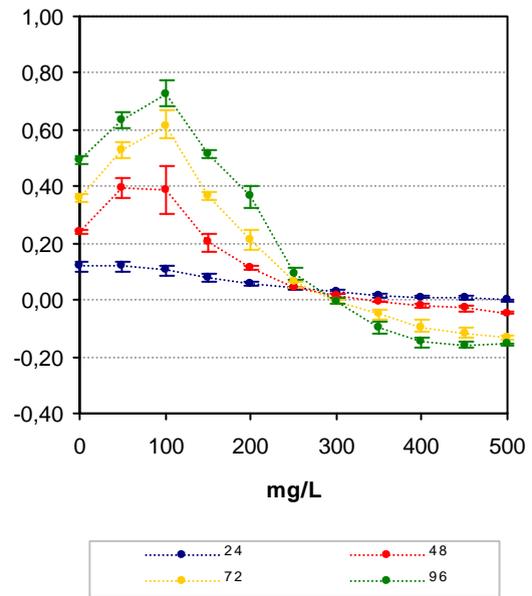


Tabla A IV.8.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *I. galbana* expuesta a diferentes concentraciones de FENOL.

| <i>I. galbana</i> | 24 horas | | 48 horas (**) | | 72 horas (**) | | 96 horas | |
|--|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,939 | | 0,849 (⊗) | | 0,966 | | 0,988 | |
| B calculado | 15,75 | | 34,34 (⊗) | | 16,04 | | 12,26 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L C ₅ H ₅ OH | t _i | p |
| 50,0 | -0,12 | 0,47287 | -6,53 (***) | 0,00103 | -7,46 (***) | 0,00019 | -7,32 (***) | 0,00071 |
| 100,0 | 1,70 | 0,16002 | -6,30 (***) | 0,01546 | -10,92 (***) | 0,00055 | -11,88 (***) | 0,00056 |
| 150,0 | 4,92 (*) | 0,01385 | 1,74 | 0,05508 | -0,19 | 0,36823 | -1,14 | 0,07502 |
| 200,0 | 7,43 | 0,00124 | 5,99 (*) | 0,00003 | 7,50 (*) | 0,00124 | 6,59 (*) | 0,00269 |
| 250,0 | 9,12 | 0,00055 | 9,61 | 0,00000 | 15,80 | 0,00000 | 20,41 | 0,00001 |
| 300,0 | 10,62 | 0,00034 | 11,03 | 0,00000 | 20,07 | 0,00000 | 25,28 | 0,00000 |
| 350,0 | 12,43 | 0,00018 | 12,24 | 0,00000 | 22,96 | 0,00000 | 30,14 | 0,00000 |
| 400,0 | 13,16 | 0,00013 | 13,03 | 0,00000 | 26,25 | 0,00001 | 32,68 | 0,00000 |
| 450,0 | 13,28 | 0,00014 | 13,68 | 0,00000 | 28,22 | 0,00000 | 33,22 | 0,00000 |
| 500,0 | 14,53 | 0,00009 | 14,66 | 0,00000 | 29,12 | 0,00000 | 33,05 | 0,00000 |
| MSD | 0,022 | | 0,021 | | 0,018 | | 0,052 | |
| % reducción | 18,48 | | 22,06 | | 13,28 | | 10,50 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) ** Análisis estadístico realizado a partir de los datos transformados logarítmicamente ($\log(x+1)$). ***La media para esta concentración es significativamente mayor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) (⊗) Estadístico calculado mayor que el valor crítico (No distribución normal o No homogeneidad de la varianza) | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|-------------|------|
| t=72 h | n=18 (**) | | n=21 (**) | | n=24 (**) | | n=27 (**) | | n=30 (**) | | n=33 (**) | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,958 | | 0,943 | | 0,950 | | 0,960 | | 0,964 | | 0,966 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 10,94 | | 13,79 (⊗) | | 14,49 (⊗) | | 14,97 | | 15,14 | | 16,04 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L Fenol | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 50,0 | -6,96(***) | 0,00 | -7,48(***) | 0,00 | -7,81(***) | 0,00 | -7,42(***) | 0,00 | -7,22(***) | 0,00 | -7,46(***) | 0,00 |
| 100,0 | -10,18(***) | 0,00 | -10,94(***) | 0,00 | -11,42(***) | 0,00 | -10,85(***) | 0,00 | -10,55(***) | 0,00 | -10,92(***) | 0,00 |
| 150,0 | -0,17 | 0,37 | -0,19 | 0,37 | -0,20 | 0,37 | -0,19 | 0,37 | -0,18 | 0,37 | -0,19 | 0,37 |
| 200,0 | 7,00(*) | 0,00 | 7,52(*) | 0,00 | 7,85(*) | 0,00 | 7,46(*) | 0,00 | 7,25(*) | 0,00 | 7,50(*) | 0,00 |
| 250,0 | 14,73 | 0,00 | 15,82 | 0,00 | 16,52 | 0,00 | 15,70 | 0,00 | 15,27 | 0,00 | 15,80 | 0,00 |
| 300,0 | --- | --- | 20,10 | 0,00 | 20,99 | 0,00 | 19,94 | 0,00 | 19,40 | 0,00 | 20,07 | 0,00 |
| 350,0 | --- | --- | --- | --- | 24,01 | 0,00 | 22,81 | 0,00 | 22,19 | 0,00 | 22,96 | 0,00 |
| 400,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 26,09 | 0,00 | 25,37 | 0,00 | 26,25 | 0,00 |
| 450,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 27,28 | 0,00 | 28,22 | 0,00 |
| 500,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 29,12 | 0,00 |
| MSD | 0,018 | | 0,017 | | 0,016 | | 0,017 | | 0,018 | | 0,018 | |
| % reducción | 13,49 | | 12,71 | | 12,31 | | 13,06 | | 13,53 | | 13,28 | |
| * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) ** Análisis estadístico realizado a partir de los datos transformados logarítmicamente ($\log(x+1)$). ***La media para esta concentración es significativamente mayor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | | | | | |

Tabla A IV.9.
Valores de ICp del ensayo de *I. galbana* y FENOL a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de FENOL estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expan. Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 109,2267 | 106,9298 | 108,1329 | 109,3277 | 110,8965 | 112,7333 | 0,7419 |
| | 25 | 146,1334 | 134,1979 | 140,4498 | 146,4516 | 153,9502 | 162,5487 | 3,5871 |
| | 50 | 187,4275 | 172,9129 | 180,5158 | 187,6919 | 197,9317 | 209,4863 | 4,5758 |
| | 75 | 229,5644 | 218,4732 | 224,2829 | 229,4218 | 233,7739 | 238,4043 | 2,4877 |
| | 95 | 280,8248 | 278,8751 | 279,8964 | 280,8181 | 281,6751 | 282,6105 | 0,4615 |
| 96 | 5 | 109,2267 | 106,9048 | 108,1210 | 109,3065 | 110,9540 | 112,8541 | 0,7289 |
| | 25 | 146,1334 | 134,3173 | 140,5067 | 146,3750 | 153,0000 | 160,5533 | 3,4154 |
| | 50 | 187,4275 | 172,6917 | 180,4104 | 187,7065 | 198,9255 | 211,5733 | 4,4963 |
| | 75 | 229,5644 | 217,4101 | 223,7766 | 229,2274 | 233,5212 | 237,8738 | 2,5132 |
| | 95 | 280,8248 | 278,8192 | 279,8698 | 280,8108 | 281,7458 | 282,7589 | 0,4906 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

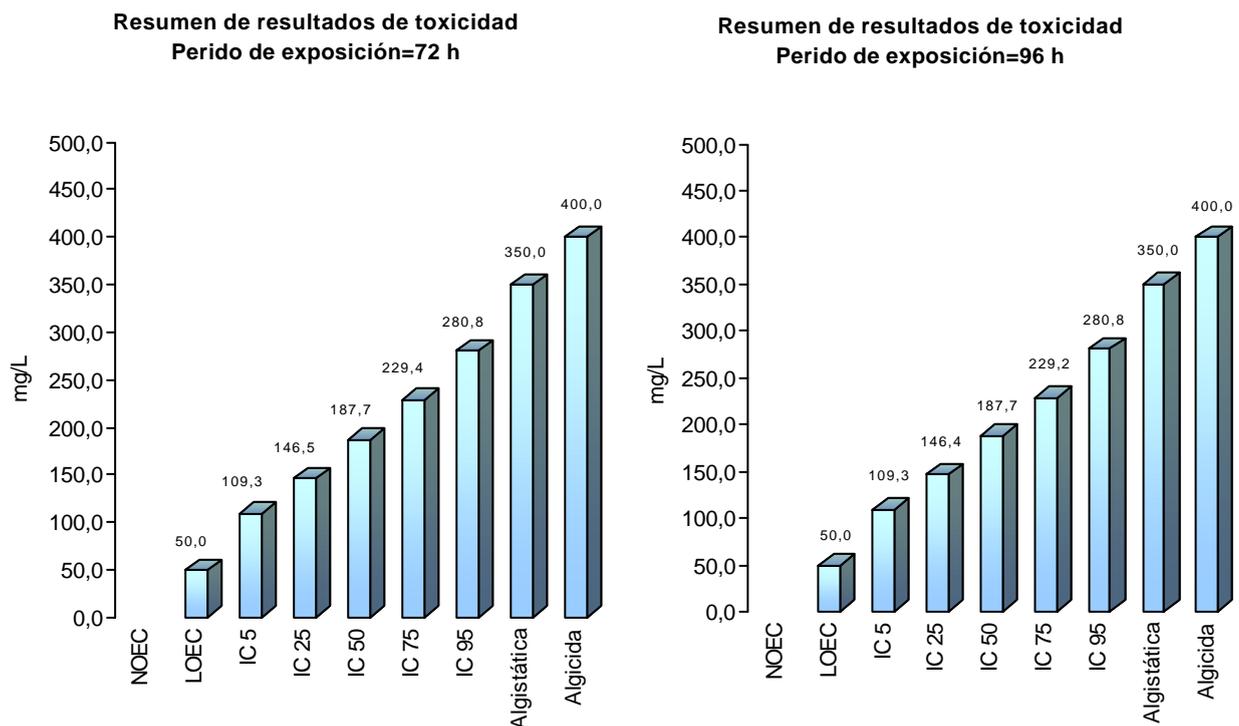
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de *fenol* ensayadas con *I. galbana* (350, 400, 450 y 500 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa del vial de 350 mg/L de fenol, sin embargo en el resto de concentraciones no se observó ninguna diferencia. Por tanto se establecen las siguientes concentraciones:

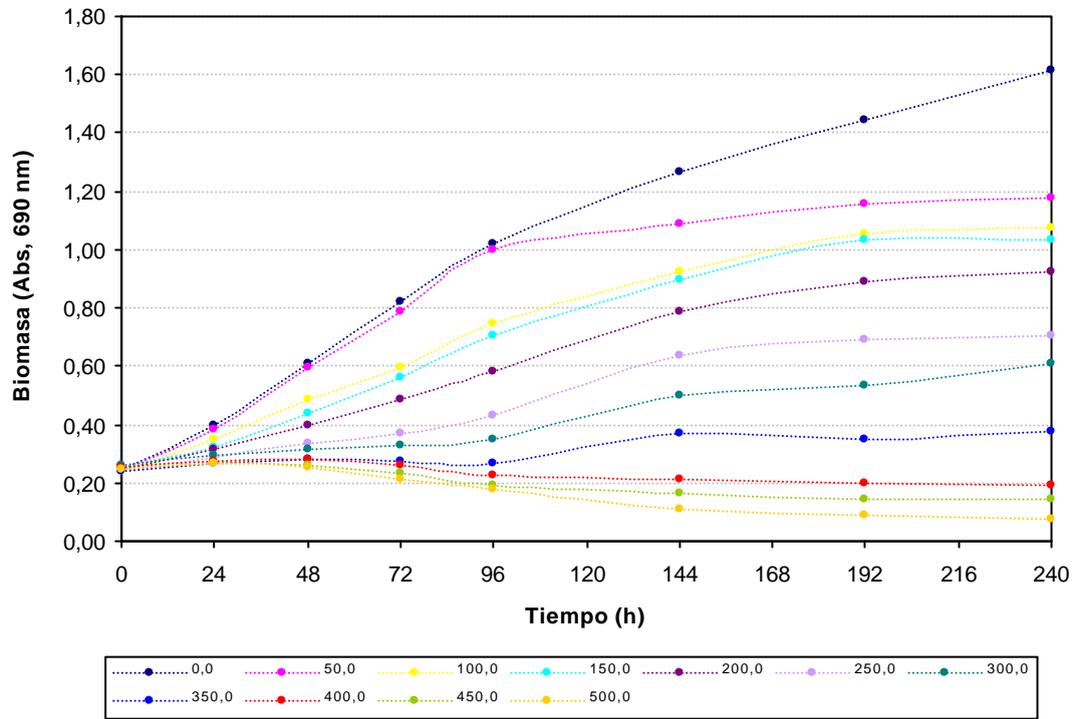
- Concentración alguistática= 350 mg/L
- Concentración alguicida= 400 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

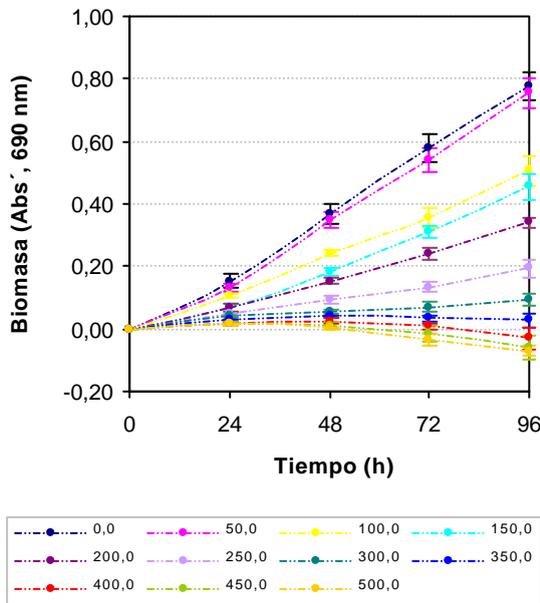
De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de *fenol* y *I. galbana*.



Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

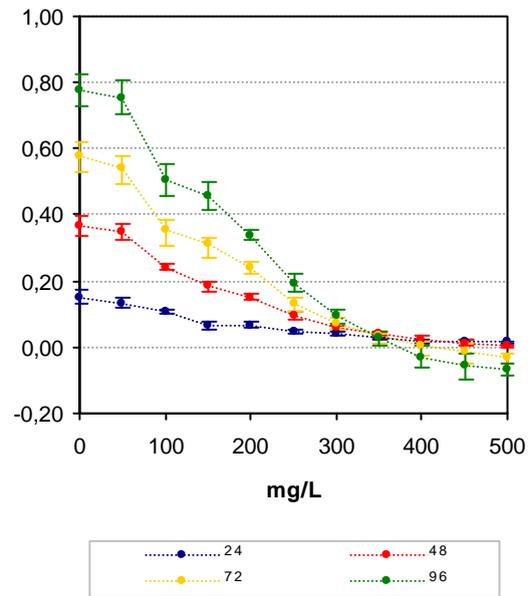


Tabla. A IV.12.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *D. salina* expuesta a diferentes concentraciones de FENOL.

| <i>D. salina</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,951 | | 0,948 | | 0,983 | | 0,964 | |
| B calculado | 11,59 | | 14,99 | | 9,48 | | 5,29 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L C ₆ H ₅ OH | t _i | p |
| 50,0 | 2,10 | 0,15485 | 1,42 | 0,25157 | 1,76 | 0,18017 | 0,78 | 0,30253 |
| 100,0 | 5,76 (*) | 0,01204 | 10,26 (*) | 0,00152 | 10,92 (*) | 0,00109 | 9,38 (*) | 0,00114 |
| 150,0 | 10,32 | 0,00225 | 15,08 | 0,00043 | 13,18 | 0,00036 | 11,18 | 0,00044 |
| 200,0 | 10,37 | 0,00193 | 17,68 | 0,00018 | 16,60 | 0,00014 | 15,24 | 0,00006 |
| 250,0 | 12,87 | 0,00066 | 22,47 | 0,00008 | 21,82 | 0,00005 | 20,30 | 0,00003 |
| 300,0 | 13,82 | 0,00052 | 25,46 | 0,00004 | 24,95 | 0,00003 | 23,84 | 0,00001 |
| 350,0 | 15,42 | 0,00033 | 26,93 | 0,00003 | 26,81 | 0,00002 | 26,12 | 0,00001 |
| 400,0 | 16,66 | 0,00025 | 28,11 | 0,00003 | 28,06 | 0,00001 | 28,13 | 0,00001 |
| 450,0 | 16,53 | 0,00027 | 29,10 | 0,00003 | 29,04 | 0,00002 | 29,05 | 0,00001 |
| 500,0 | 16,74 | 0,00023 | 29,89 | 0,00002 | 30,11 | 0,00001 | 29,48 | 0,00000 |
| MSD | 0,021 | | 0,032 | | 0,054 | | 0,076 | |
| % reducción | 14,11 | | 8,74 | | 9,28 | | 9,75 | |
| <i>W crítica (N=33 y α=0,05)= 0,931; B crítica (V=No conc.-1, y α=0,05)=18,31; T crítica (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64</i> * La media para esta concentración es significativamente menor que la media del control a un $\alpha = 0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,976 | | 0,976 | | 0,976 | | 0,974 | | 0,982 | | 0,983 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 3,25 | | 3,93 | | 6,65 | | 9,12 | | 9,12 | | 9,48 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L Fenol | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 50,0 | 1,46 | 0,18 | 1,53 | 0,18 | 1,63 | 0,18 | 1,72 | 0,18 | 1,71 | 0,18 | 1,76 | 0,18 |
| 100,0 | 9,04(*) | 0,00 | 9,51(*) | 0,00 | 10,11(*) | 0,00 | 10,67(*) | 0,00 | 10,65(*) | 0,00 | 10,92(*) | 0,00 |
| 150,0 | 10,92 | 0,00 | 11,49 | 0,00 | 12,21 | 0,00 | 12,88 | 0,00 | 12,86 | 0,00 | 13,18 | 0,00 |
| 200,0 | 13,75 | 0,00 | 14,46 | 0,00 | 15,38 | 0,00 | 16,22 | 0,00 | 16,20 | 0,00 | 16,60 | 0,00 |
| 250,0 | 18,08 | 0,00 | 19,01 | 0,00 | 20,21 | 0,00 | 21,32 | 0,00 | 21,29 | 0,00 | 21,82 | 0,00 |
| 300,0 | --- | --- | 21,74 | 0,00 | 23,12 | 0,00 | 24,38 | 0,00 | 24,35 | 0,00 | 24,95 | 0,00 |
| 350,0 | --- | --- | --- | --- | 24,84 | 0,00 | 26,20 | 0,00 | 26,16 | 0,00 | 26,81 | 0,00 |
| 400,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 27,42 | 0,00 | 27,38 | 0,00 | 28,06 | 0,00 |
| 450,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 28,34 | 0,00 | 29,04 | 0,00 |
| 500,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 30,11 | 0,00 |
| MSD | 0,061 | | 0,059 | | 0,056 | | 0,054 | | 0,054 | | 0,054 | |
| % reducción | 10,61 | | 10,21 | | 9,72 | | 9,29 | | 9,37 | | 9,28 | |
| * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha = 0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | | | | | |

Tabla A IV.13.
Valores de ICp del ensayo de *D. salina* y FENOL a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de FENOL estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expan. Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 40,4673 | -9,6034 | 16,6241 | 40,4790 | 57,3925 | 76,0102 | 13,8644 |
| | 25 | 79,2115 | 55,9299 | 68,1250 | 79,0709 | 88,2149 | 98,1188 | 5,2013 |
| | 50 | 165,1442 | 121,0786 | 144,1606 | 164,3039 | 180,9524 | 198,3413 | 9,7559 |
| | 75 | 245,2830 | 230,0669 | 238,0372 | 245,2888 | 254,1463 | 263,8960 | 4,1245 |
| | 95 | 358,1579 | 330,6682 | 345,0676 | 257,5028 | 368,3437 | 379,5482 | 6,2725 |
| 96 | 5 | 53,3435 | -8,6995 | 23,7992 | 49,3181 | 58,5978 | 64,3776 | 10,3657 |
| | 25 | 84,8009 | 66,8951 | 76,2744 | 84,6285 | 94,3847 | 104,9268 | 4,6983 |
| | 50 | 179,0115 | 147,5300 | 164,0203 | 177,7841 | 189,0101 | 200,0085 | 6,5283 |
| | 75 | 250,0410 | 231,4162 | 241,1720 | 250,5389 | 261,4423 | 273,9838 | 5,4786 |
| | 95 | 341,1862 | 319,5064 | 330,8625 | 341,6827 | 359,2448 | 379,1092 | 6,8336 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

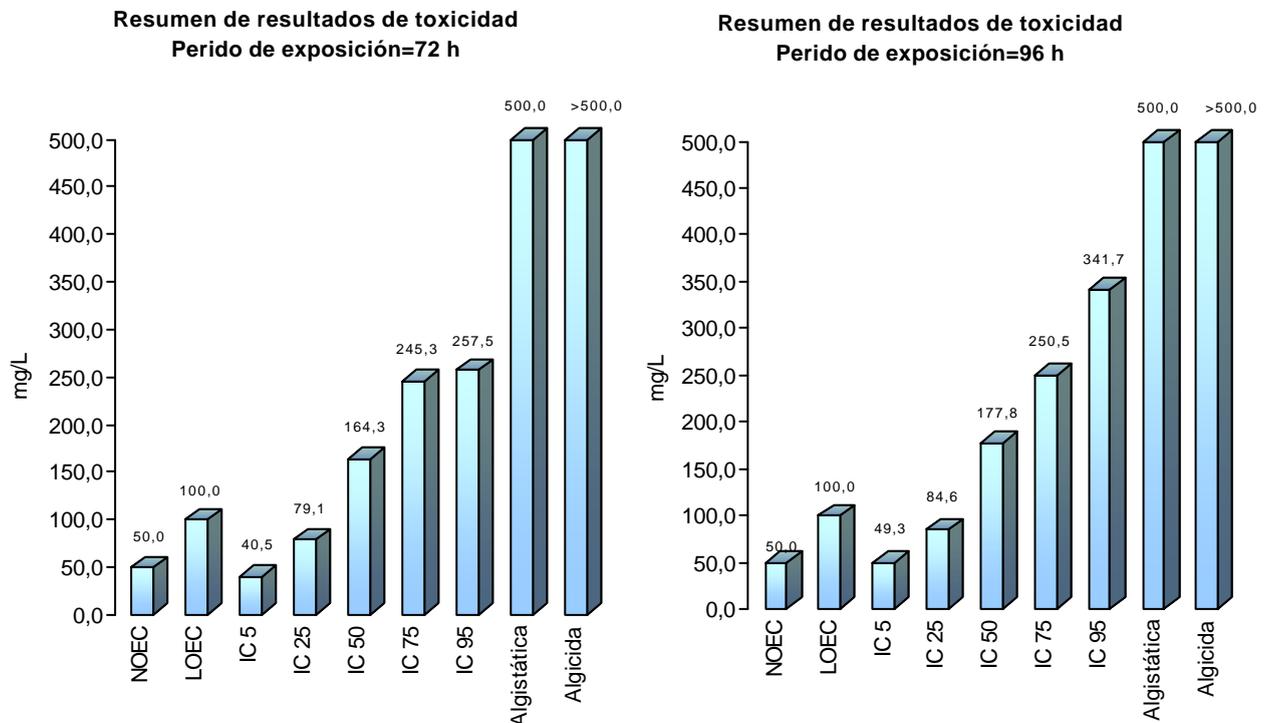
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de *fenol* ensayadas con *D. salina* (350, 400, 450 y 500 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa en todos los viales.

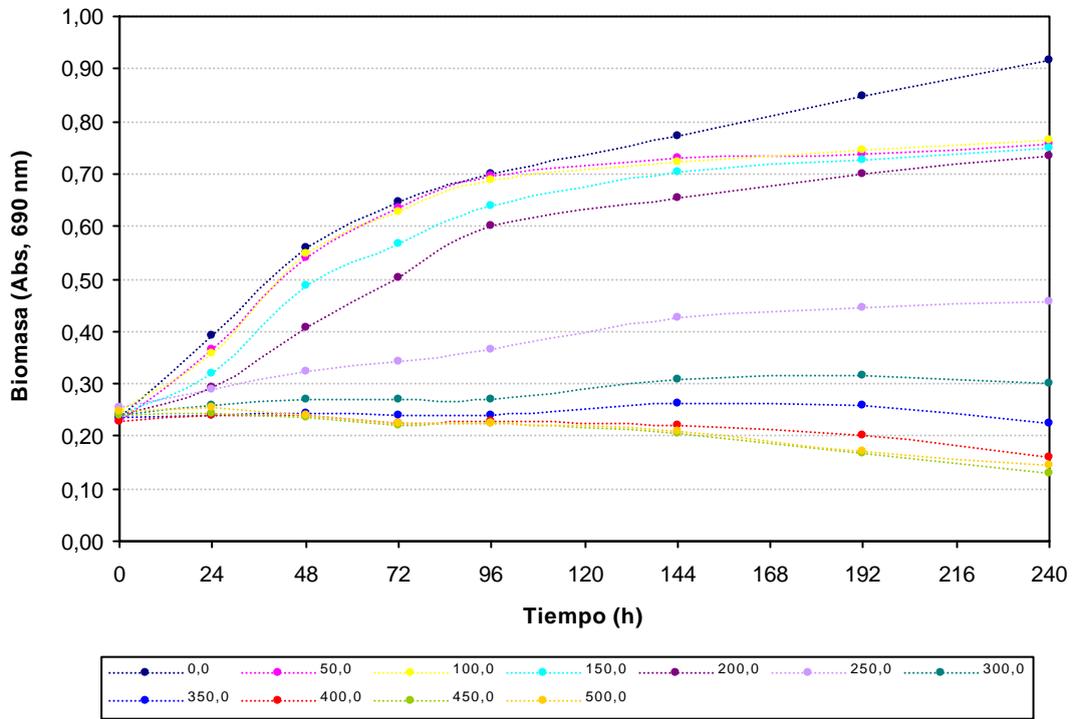
- Concentración alguistática= 500 mg/L
- Concentración alguicida= No determinado experimentalmente

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

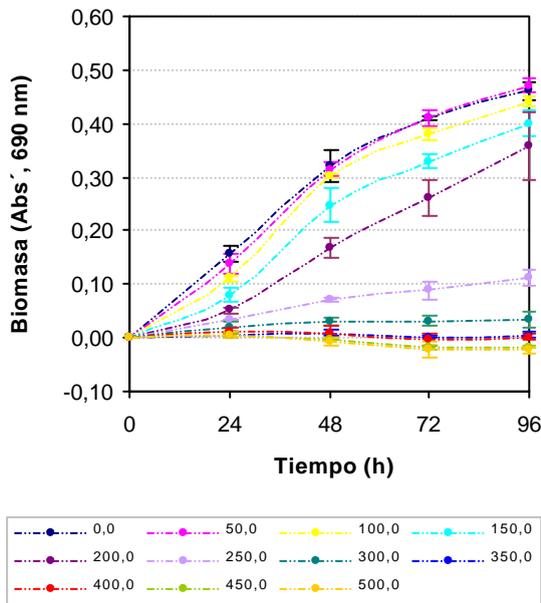
De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de *fenol* y *D. salina*.



Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

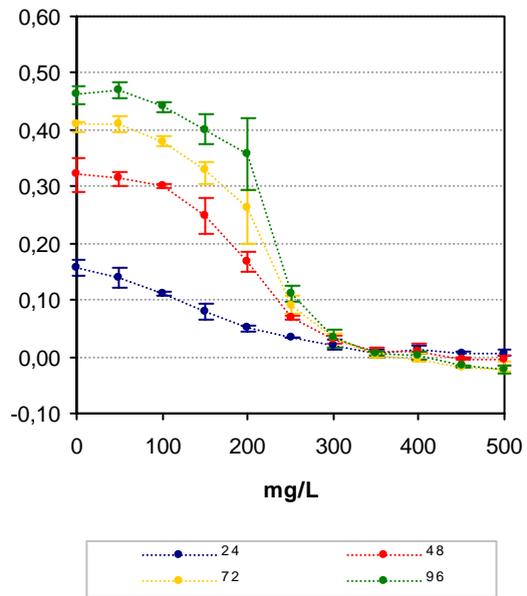


Tabla A IV.16.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *C. gracilis* expuesta a diferentes concentraciones de FENOL.

| <i>C. gracilis</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,960 | | 0,951 | | 0,964 | | 0,964 | |
| B calculado | 14,01 | | 13,37 | | 16,43 | | 17,30 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L Fenol | t _i | p |
| 50,0 | 2,55 | 0,10791 | 0,57 | 0,35364 | 0,14 | 0,43438 | -0,66 | 0,26490 |
| 100,0 | 6,22 (*) | 0,00309 | 1,52 | 0,15394 | 2,66 (*) | 0,00349 | 1,65 | 0,06241 |
| 150,0 | 10,43 | 0,00119 | 5,67 (*) | 0,02098 | 6,89 | 0,00020 | 4,81 (*) | 0,01278 |
| 200,0 | 14,23 | 0,00014 | 11,91 | 0,00074 | 12,57 | 0,00074 | 6,51 | 0,00732 |
| 250,0 | 16,52 | 0,00006 | 19,44 | 0,00006 | 27,07 | 0,00000 | 27,58 | 0,00000 |
| 300,0 | 18,26 | 0,00007 | 22,46 | 0,00004 | 31,86 | 0,00000 | 33,75 | 0,00000 |
| 350,0 | 20,28 | 0,00004 | 24,16 | 0,00003 | 34,35 | 0,00000 | 35,93 | 0,00000 |
| 400,0 | 19,38 | 0,00005 | 24,11 | 0,00004 | 34,86 | 0,00000 | 36,25 | 0,00000 |
| 450,0 | 20,55 | 0,00003 | 25,11 | 0,00002 | 36,06 | 0,00000 | 37,67 | 0,00000 |
| 500,0 | 20,28 | 0,00004 | 25,34 | 0,00002 | 36,43 | 0,00000 | 38,17 | 0,00000 |
| MSD | 0,020 | | 0,020 | | 0,031 | | 0,034 | |
| % reducción | 12,52 | | 12,71 | | 7,64 | | 7,26 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,948 | | 0,946 | | 0,945 | | 0,944 | | 0,942 | | 0,964 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 6,81 | | 7,58 | | 11,65 | | 12,18 | | 16,42 | | 16,43 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L Fenol | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 50,0 | 0,11 | 0,43 | 0,12 | 0,43 | 0,13 | 0,43 | 0,13 | 0,43 | 0,14 | 0,43 | 0,14 | 0,43 |
| 100,0 | 2,16 | 0,00 | 2,28 | 0,00 | 2,43 | 0,00 | 2,51 | 0,00 | 2,65(*) | 0,00 | 2,66(*) | 0,00 |
| 150,0 | 5,60(*) | 0,00 | 5,90(*) | 0,00 | 6,29(*) | 0,00 | 6,51(*) | 0,00 | 6,85 | 0,00 | 6,89 | 0,00 |
| 200,0 | 10,22 | 0,00 | 10,77 | 0,00 | 11,49 | 0,00 | 11,88 | 0,00 | 12,51 | 0,00 | 12,57 | 0,00 |
| 250,0 | 22,01 | 0,00 | 23,20 | 0,00 | 24,74 | 0,00 | 25,59 | 0,00 | 26,93 | 0,00 | 27,07 | 0,00 |
| 300,0 | --- | --- | 27,30 | 0,00 | 29,11 | 0,00 | 30,12 | 0,00 | 31,70 | 0,00 | 31,86 | 0,00 |
| 350,0 | --- | --- | --- | --- | 31,39 | 0,00 | 32,47 | 0,00 | 34,18 | 0,00 | 34,35 | 0,00 |
| 400,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 32,95 | 0,00 | 34,68 | 0,00 | 34,86 | 0,00 |
| 450,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 35,87 | 0,00 | 36,06 | 0,00 |
| 500,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 36,43 | 0,00 |
| MSD | 0,044 | | 0,035 | | 0,033 | | 0,032 | | 0,031 | | 0,031 | |
| % reducción | 8,91 | | 8,55 | | 8,11 | | 7,90 | | 7,56 | | 7,64 | |
| * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | | | | | |

Tabla A IV.17.
Valores de ICp del ensayo de *C. gracilis* y FENOL a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de FENOL estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expan. Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 81,5000 | 48,5770 | 65,8224 | 78,9194 | 91,9697 | 103,4864 | 6,8169 |
| | 25 | 165,3941 | 147,0438 | 156,6558 | 165,6621 | 180,7927 | 197,7311 | 5,8199 |
| | 50 | 216,2162 | 202,1096 | 209,4988 | 215,6523 | 221,3396 | 226,9754 | 3,1938 |
| | 75 | 245,9942 | 238,4940 | 242,4227 | 246,0521 | 253,7887 | 262,3627 | 2,5947 |
| | 95 | 319,2697 | 295,8444 | 308,1148 | 318,6441 | 327,4694 | 336,4891 | 5,0434 |
| 96 | 5 | 96,2748 | 54,4465 | 76,3566 | 95,3404 | 113,9430 | 133,3780 | 9,6776 |
| | 25 | 201,8159 | 139,8775 | 172,3214 | 198,0877 | 209,6745 | 218,3189 | 11,0494 |
| | 50 | 225,4223 | 205,9272 | 216,1389 | 224,7860 | 229,8498 | 234,7201 | 3,3490 |
| | 75 | 249,0287 | 244,2054 | 246,7319 | 249,4084 | 256,1462 | 263,9754 | 2,2296 |
| | 95 | 318,1476 | 273,6541 | 296,9602 | 316,5386 | 329,6635 | 342,3309 | 9,1293 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

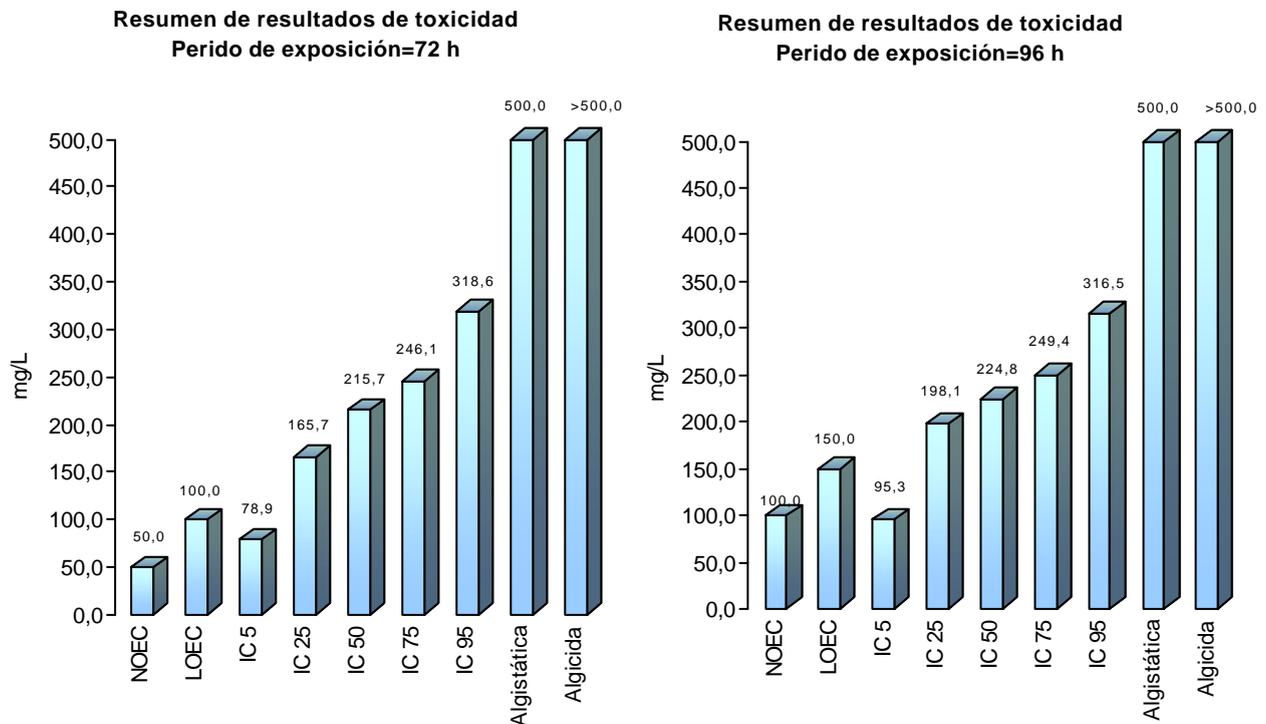
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de *fenol* ensayadas con *C. gracilis* (350, 400, 450 y 500 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa en todos los viales.

- Concentración alguistática= 500 mg/L
- Concentración alguicida= No determinado experimentalmente

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de *fenol* y *C. gracilis*.



2.5. Tetraselmis chuii

Tabla A IV.18.

Evolución de la biomasa de Tetraselmis chuii. Ensayo de FENOL.

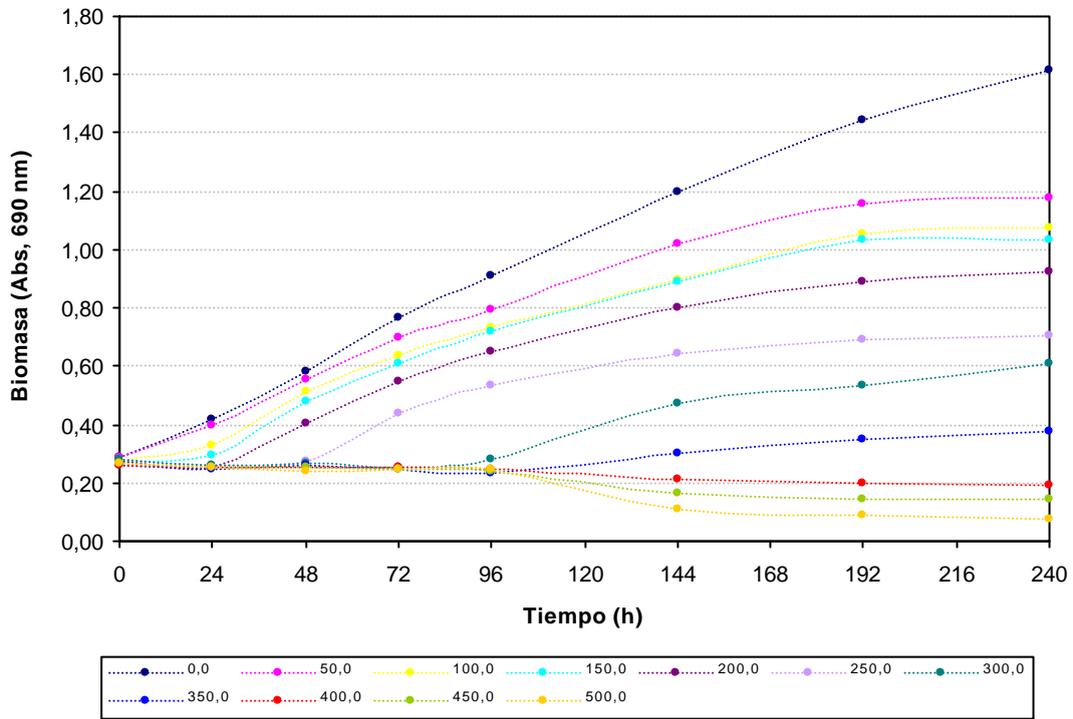
| t(d) | T. chuii. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | t(h) | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | |
|-------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| 0 | 0,280 | 0,425 | 0,586 | 0,777 | 0,925 | | | | 0,000 | 0,145 | 0,306 | 0,497 | 0,645 | | | | |
| | 0,295 | 0,429 | 0,584 | 0,767 | 0,913 | 1,198 | 1,441 | 1,614 | 0,000 | 0,134 | 0,289 | 0,472 | 0,618 | 0,903 | 1,146 | 1,319 | |
| | 0,284 | 0,400 | 0,567 | 0,758 | 0,890 | | | | 0,000 | 0,116 | 0,283 | 0,474 | 0,606 | | | | |
| 50,0 | 0,278 | 0,396 | 0,560 | 0,700 | 0,782 | | | | 0,000 | 0,118 | 0,282 | 0,422 | 0,504 | | | | |
| | 0,296 | 0,409 | 0,568 | 0,711 | 0,813 | 1,020 | 1,156 | 1,178 | 0,000 | 0,113 | 0,272 | 0,415 | 0,517 | 0,724 | 0,860 | 0,882 | |
| | 0,288 | 0,378 | 0,543 | 0,692 | 0,795 | | | | 0,000 | 0,090 | 0,255 | 0,404 | 0,507 | | | | |
| 100,0 | 0,265 | 0,347 | 0,504 | 0,621 | 0,683 | | | | 0,000 | 0,082 | 0,239 | 0,356 | 0,418 | | | | |
| | 0,265 | 0,317 | 0,506 | 0,625 | 0,733 | 0,897 | 1,054 | 1,076 | 0,000 | 0,052 | 0,241 | 0,360 | 0,468 | 0,632 | 0,789 | 0,811 | |
| | 0,285 | 0,327 | 0,533 | 0,668 | 0,785 | | | | 0,000 | 0,042 | 0,248 | 0,383 | 0,500 | | | | |
| 150,0 | 0,277 | 0,332 | 0,505 | 0,626 | 0,752 | | | | 0,000 | 0,055 | 0,228 | 0,349 | 0,475 | | | | |
| | 0,275 | 0,291 | 0,476 | 0,606 | 0,710 | 0,888 | 1,033 | 1,035 | 0,000 | 0,016 | 0,201 | 0,331 | 0,435 | 0,613 | 0,758 | 0,760 | |
| | 0,263 | 0,265 | 0,466 | 0,586 | 0,691 | | | | 0,000 | 0,002 | 0,203 | 0,323 | 0,428 | | | | |
| 200,0 | 0,275 | 0,256 | 0,413 | 0,529 | 0,675 | | | | 0,000 | -0,019 | 0,138 | 0,254 | 0,400 | | | | |
| | 0,286 | 0,264 | 0,397 | 0,561 | 0,644 | 0,799 | 0,893 | 0,923 | 0,000 | -0,022 | 0,111 | 0,275 | 0,358 | 0,513 | 0,607 | 0,637 | |
| | 0,259 | 0,245 | 0,395 | 0,554 | 0,623 | | | | 0,000 | -0,014 | 0,136 | 0,295 | 0,364 | | | | |
| 250,0 | 0,285 | 0,273 | 0,285 | 0,501 | 0,513 | | | | 0,000 | -0,012 | 0,000 | 0,216 | 0,228 | | | | |
| | 0,287 | 0,260 | 0,280 | 0,447 | 0,567 | 0,642 | 0,690 | 0,706 | 0,000 | -0,027 | -0,007 | 0,160 | 0,280 | 0,355 | 0,403 | 0,419 | |
| | 0,269 | 0,247 | 0,262 | 0,359 | 0,526 | | | | 0,000 | -0,022 | -0,007 | 0,090 | 0,257 | | | | |
| 300,0 | 0,263 | 0,247 | 0,253 | 0,252 | 0,289 | | | | 0,000 | -0,016 | -0,010 | -0,011 | 0,026 | | | | |
| | 0,282 | 0,266 | 0,271 | 0,250 | 0,278 | 0,475 | 0,533 | 0,609 | 0,000 | -0,016 | -0,011 | -0,032 | -0,004 | 0,193 | 0,251 | 0,327 | |
| | 0,287 | 0,270 | 0,278 | 0,262 | 0,280 | | | | 0,000 | -0,017 | -0,009 | -0,025 | -0,007 | | | | |
| 350,0 | 0,274 | 0,265 | 0,274 | 0,265 | 0,244 | | | | 0,000 | -0,009 | 0,000 | -0,009 | -0,030 | | | | |
| | 0,256 | 0,242 | 0,272 | 0,248 | 0,211 | 0,300 | 0,350 | 0,375 | 0,000 | -0,014 | 0,016 | -0,008 | -0,045 | 0,044 | 0,094 | 0,119 | |
| | 0,249 | 0,224 | 0,237 | 0,233 | 0,233 | | | | 0,000 | -0,025 | -0,012 | -0,016 | -0,016 | | | | |
| 400,0 | 0,258 | 0,264 | 0,251 | 0,250 | 0,246 | | | | 0,000 | 0,006 | -0,007 | -0,008 | -0,012 | | | | |
| | 0,265 | 0,258 | 0,256 | 0,257 | 0,256 | 0,213 | 0,198 | 0,191 | 0,000 | -0,007 | -0,009 | -0,008 | -0,009 | -0,052 | -0,067 | -0,074 | |
| | 0,251 | 0,239 | 0,247 | 0,245 | 0,236 | | | | 0,000 | -0,012 | -0,004 | -0,006 | -0,015 | | | | |
| 450,0 | 0,265 | 0,261 | 0,249 | 0,250 | 0,235 | | | | 0,000 | -0,004 | -0,016 | -0,015 | -0,030 | | | | |
| | 0,254 | 0,256 | 0,247 | 0,237 | 0,235 | 0,165 | 0,147 | 0,142 | 0,000 | 0,002 | -0,007 | -0,017 | -0,019 | -0,089 | -0,107 | -0,112 | |
| | 0,274 | 0,249 | 0,257 | 0,254 | 0,247 | | | | 0,000 | -0,025 | -0,017 | -0,020 | -0,027 | | | | |
| 500,0 | 0,270 | 0,269 | 0,255 | 0,255 | 0,250 | | | | 0,000 | -0,001 | -0,015 | -0,015 | -0,020 | | | | |
| | 0,263 | 0,242 | 0,242 | 0,240 | 0,247 | 0,108 | 0,087 | 0,078 | 0,000 | -0,021 | -0,021 | -0,023 | -0,016 | -0,155 | -0,176 | -0,185 | |
| | 0,261 | 0,252 | 0,229 | 0,234 | 0,234 | | | | 0,000 | -0,009 | -0,032 | -0,027 | -0,027 | | | | |

Tabla A IV.19.

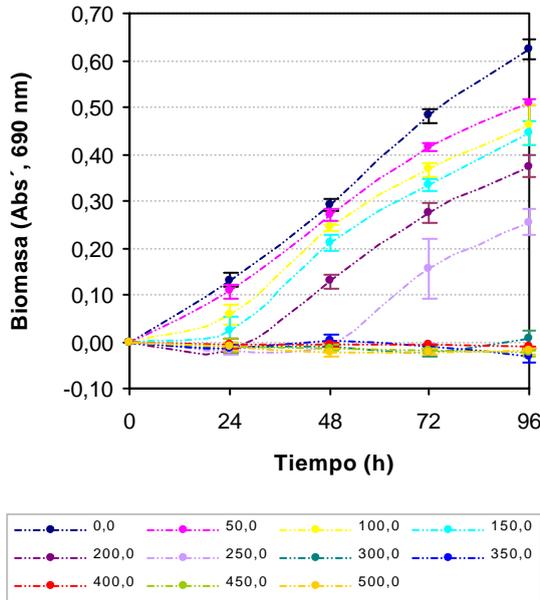
Variación de la biomasa algal a lo largo de las concentraciones de ensayo

| t (h) | mg/L C ₆ H ₅ OH | | | | | | | | | | | Promedio |
|-------|---------------------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| | 0,0 | 50,0 | 100,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 300,0 | 350,0 | 400,0 | 450,0 | 500,0 | |
| 24 | 0,101 | 0,107 | 0,058 | 0,024 | -0,018 | -0,020 | -0,016 | -0,016 | -0,004 | -0,008 | -0,010 | DesvEst |
| | 0,028 | 0,015 | 0,021 | 0,028 | 0,004 | 0,008 | 0,001 | 0,008 | 0,009 | 0,014 | 0,010 | |
| 48 | 0,248 | 0,270 | 0,242 | 0,211 | 0,128 | -0,004 | -0,010 | 0,001 | -0,007 | -0,013 | -0,023 | DesvEst |
| | 0,020 | 0,013 | 0,005 | 0,015 | 0,015 | 0,004 | 0,001 | 0,014 | 0,003 | 0,006 | 0,009 | |
| 72 | 0,376 | 0,414 | 0,366 | 0,334 | 0,275 | 0,155 | -0,023 | -0,011 | -0,007 | -0,017 | -0,022 | DesvEst |
| | 0,033 | 0,009 | 0,015 | 0,013 | 0,021 | 0,063 | 0,011 | 0,005 | 0,001 | 0,003 | 0,006 | |
| 96 | 0,480 | 0,509 | 0,461 | 0,446 | 0,374 | 0,255 | 0,005 | -0,030 | -0,012 | -0,025 | -0,021 | DesvEst |
| | 0,031 | 0,006 | 0,041 | 0,026 | 0,023 | 0,026 | 0,018 | 0,014 | 0,003 | 0,006 | 0,006 | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

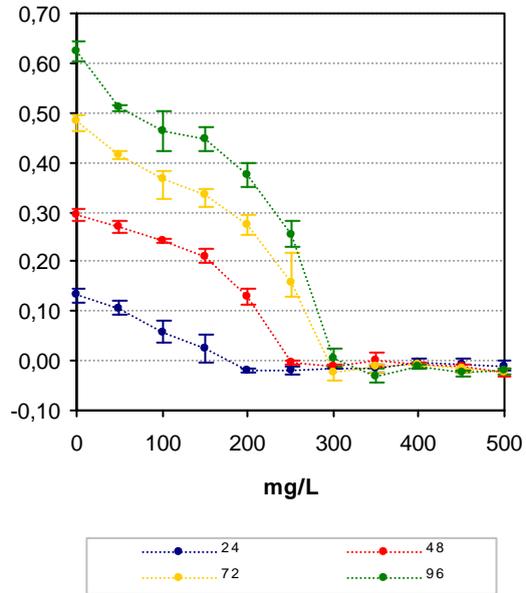


Tabla A IV.20.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *T. chuii* expuesta a diferentes concentraciones de FENOL.

| <i>T. chuii</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------------|--------|----------------|---------|----------------|--------|----------------|--------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,977 | | 0,979 | | 0,965 | | 0,973 | |
| B calculado | 17,33 | | 15,51 | | 17,63 | | 16,33 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L Fenol | t _i | p | t _i | p | t _i | p | t _i | p |
| 50,0 | 2,16 | 0,0553 | 2,78 (*) | 0,04646 | 6,32 (*) | 0,0011 | 6,80 (*) | 0,0004 |
| 100,0 | 6,39 (*) | 0,0038 | 6,04 | 0,00126 | 10,76 | 0,0003 | 9,64 | 0,0019 |
| 150,0 | 9,39 | 0,0020 | 9,91 | 0,00089 | 13,76 | 0,0001 | 10,59 | 0,0003 |
| 200,0 | 13,12 | 0,0000 | 19,86 | 0,00006 | 19,36 | 0,0001 | 14,90 | 0,0001 |
| 250,0 | 13,30 | 0,0000 | 35,94 | 0,00000 | 29,78 | 0,0000 | 22,02 | 0,0000 |
| 300,0 | 12,95 | 0,0000 | 36,58 | 0,00000 | 47,26 | 0,0000 | 36,98 | 0,0000 |
| 350,0 | 12,92 | 0,0001 | 35,21 | 0,00001 | 46,17 | 0,0000 | 39,10 | 0,0000 |
| 400,0 | 11,90 | 0,0001 | 36,18 | 0,00000 | 45,82 | 0,0000 | 38,00 | 0,0000 |
| 450,0 | 12,31 | 0,0001 | 36,99 | 0,00000 | 46,76 | 0,0000 | 38,80 | 0,0000 |
| 500,0 | 12,42 | 0,0001 | 38,12 | 0,00000 | 47,17 | 0,0000 | 38,54 | 0,0000 |
| MSD | 0,030 | | 0,022 | | 0,028 | | 0,044 | |
| % reducción | 22,92 | | 7,46 | | 5,85 | | 7,08 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,949 | | 0,953 | | 0,963 | | 0,965 | | 0,962 | | 0,965 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 2,02 | | 2,49 | | 5,24 | | 12,18 | | 16,33 | | 17,63 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L Fenol | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 50,0 | 4,91(*) | 0,00 | 5,13(*) | 0,00 | 5,45(*) | 0,00 | 5,78(*) | 0,00 | 6,08(*) | 0,00 | 6,32(*) | 0,00 |
| 100,0 | 8,35 | 0,00 | 8,73 | 0,00 | 9,29 | 0,00 | 9,85 | 0,00 | 10,36 | 0,00 | 10,76 | 0,00 |
| 150,0 | 10,69 | 0,00 | 11,17 | 0,00 | 11,88 | 0,00 | 12,60 | 0,00 | 13,25 | 0,00 | 13,76 | 0,00 |
| 200,0 | 15,03 | 0,00 | 15,72 | 0,00 | 16,71 | 0,00 | 17,72 | 0,00 | 18,65 | 0,00 | 19,36 | 0,00 |
| 250,0 | 23,12 | 0,00 | 24,17 | 0,00 | 25,70 | 0,00 | 27,25 | 0,00 | 28,68 | 0,00 | 29,78 | 0,00 |
| 300,0 | --- | --- | 38,36 | 0,00 | 40,80 | 0,00 | 43,26 | 0,00 | 45,52 | 0,00 | 47,26 | 0,00 |
| 350,0 | --- | --- | --- | --- | 39,85 | 0,00 | 42,25 | 0,00 | 44,46 | 0,00 | 46,17 | 0,00 |
| 400,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 41,94 | 0,00 | 44,13 | 0,00 | 45,82 | 0,00 |
| 450,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 45,04 | 0,00 | 46,76 | 0,00 |
| 500,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 47,17 | 0,00 |
| MSD | 0,034 | | 0,033 | | 0,032 | | 0,030 | | 0,029 | | 0,028 | |
| % reducción | 7,13 | | 6,91 | | 6,57 | | 6,25 | | 5,98 | | 5,85 | |
| * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | | | | | |

Tabla A IV.21.
Valores de ICp del ensayo de *T. chuii* y FENOL a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de FENOL estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expan. Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 17,8589 | 11,8123 | 14,9796 | 18,1699 | 22,2956 | 27,1760 | 1,9215 |
| | 25 | 108,7240 | 71,6073 | 91,0494 | 108,9220 | 128,7671 | 150,8146 | 10,7046 |
| | 50 | 214,3156 | 197,5474 | 206,3307 | 215,0698 | 227,0370 | 241,0306 | 5,2709 |
| | 75 | 261,2929 | 220,1801 | 241,7154 | 260,0881 | 272,1644 | 284,1229 | 7,7567 |
| | 95 | 292,2586 | 280,4961 | 286,6574 | 291,8993 | 294,4252 | 296,8084 | 1,7196 |
| 96 | 5 | 13,7023 | 10,2229 | 12,0455 | 13,8114 | 15,6724 | 17,8395 | 0,9675 |
| | 25 | 94,4542 | 50,2807 | 73,4192 | 103,3078 | 152,7533 | 216,8823 | 22,5939 |
| | 50 | 226,2605 | 210,2555 | 218,6391 | 226,3608 | 234,3085 | 243,1613 | 3,9617 |
| | 75 | 269,8500 | 262,6549 | 266,4238 | 269,9605 | 272,9356 | 276,3298 | 1,6648 |
| | 95 | 294,7700 | 291,9911 | 293,4467 | 295,0954 | 298,8366 | 303,3099 | 1,2873 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

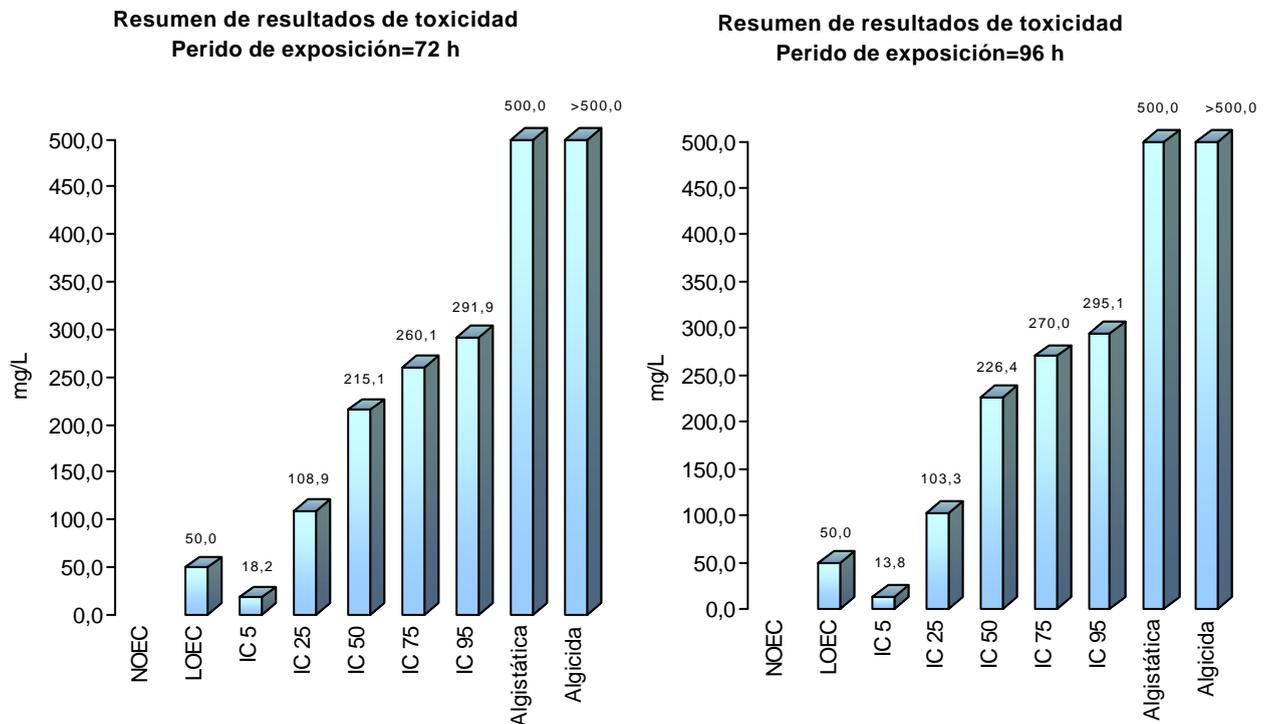
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de *fenol* ensayadas con *T. chuii* (350, 400, 450 y 500 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa en todos los viales.

- Concentración alguistática= 500 mg/L
- Concentración alguicida= No determinado experimentalmente

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de *fenol* y *T. chuii*.



3. RESULTADOS CON *ARTEMIA*

3.1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Recipiente de ensayo: placas petri de vidrio
- N° de réplicas: 5 para cada concentración y control
- N° de organismos por placa: 10
- Volumen de las placas: 30 mL
- Volumen de solución de ensayo: 20 mL
- Agua de dilución: agua de mar sintética
- Medio nutriente adicional: no
- Temperatura de ensayo: $20 \pm 0,1$ °C
- Iluminación: no, oscuridad
- Aireación: no
- Duración del ensayo: 3 días
- Respuesta observada: mortalidad, inhibición en la capacidad natatoria

ORGANISMOS DE ENSAYO

- *Artemia franciscana*, código 1309 según clasificación del Instituto de la *Artemia*, Bélgica obtenidos a partir de la eclosión de quistes de resistencia en condiciones óptimas de luz (iluminación constante), aireación (continua) y temperatura ($20 \pm 0,1$ °C).
- Nauplios de una misma cohorte de *Artemia franciscana* de entre 6 a 12 horas de vida (estadio I)

RESULTADOS OBTENIDOS

- Número de supervivientes a las 24, 48 y 72 horas de ensayo
- LC_p mediante el método Probit

3.2 RESULTADOS OBTENIDOS

Tabla A IV.22.
Ensayos de toxicidad aguda con *Artemia*. Ensayo de FENOL.

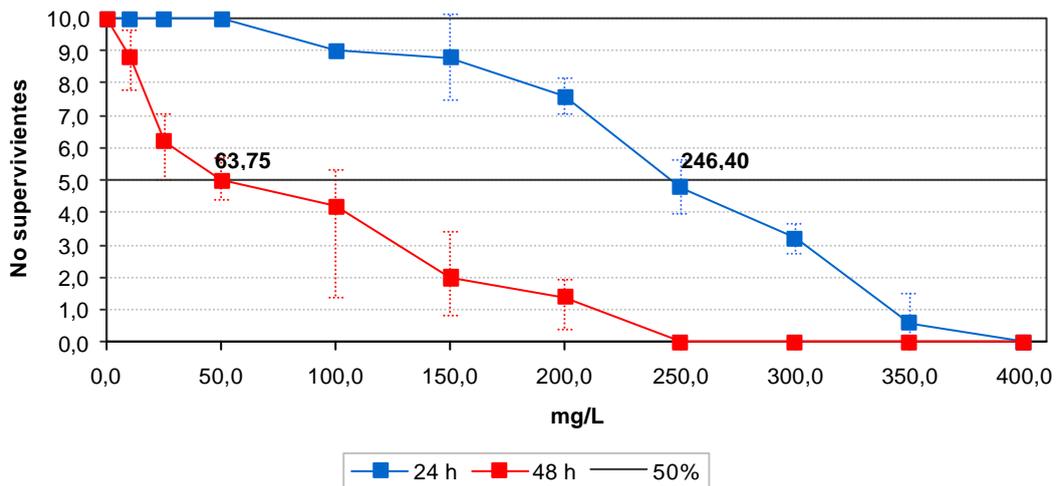
| mg/L C ₆ H ₅ OH | 24 h | | | 48 h | | | N Total |
|---------------------------------------|------|---|----|------|---|----|---------|
| | + | ± | - | + | ± | - | |
| 0,0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| 10,0 | 10 | 0 | 0 | 9 | 0 | 1 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 7 | 1 | 2 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 9 | 0 | 1 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 8 | 0 | 2 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 6 | 4 | 0 | 10 |
| 25,0 | 10 | 0 | 0 | 4 | 2 | 4 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 5 | 1 | 4 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 5 | 2 | 3 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 5 | 0 | 5 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 6 | 1 | 3 | 10 |
| 50,0 | 10 | 0 | 0 | 4 | 1 | 5 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 3 | 2 | 5 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 4 | 0 | 6 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 5 | 0 | 5 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 6 | 0 | 4 | 10 |
| 100,0 | 8 | 1 | 1 | 2 | 1 | 7 | 10 |
| | 8 | 1 | 1 | 2 | 3 | 5 | 10 |
| | 6 | 3 | 1 | 0 | 3 | 7 | 10 |
| | 7 | 2 | 1 | 0 | 5 | 5 | 10 |
| | 9 | 0 | 1 | 3 | 2 | 5 | 10 |
| 150,0 | 5 | 5 | 0 | 1 | 2 | 7 | 10 |
| | 6 | 1 | 3 | 3 | 0 | 7 | 10 |
| | 6 | 3 | 1 | 0 | 3 | 7 | 10 |
| | 7 | 1 | 2 | 0 | 1 | 9 | 10 |
| | 8 | 2 | 0 | 0 | | 10 | 10 |
| 200,0 | 1 | 7 | 2 | 0 | 1 | 9 | 10 |
| | 3 | 4 | 3 | 0 | 1 | 9 | 10 |
| | 5 | 3 | 2 | 0 | 2 | 8 | 10 |
| | 3 | 5 | 2 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| | 4 | 3 | 3 | 1 | 1 | 8 | 10 |
| 250,0 | 0 | 4 | 6 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 3 | 3 | 4 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 1 | 4 | 5 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 5 | 5 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 1 | 3 | 6 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| 300,0 | 0 | 3 | 7 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 1 | 2 | 7 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 3 | 7 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 1 | 3 | 6 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 3 | 7 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| 350,0 | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 2 | 8 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| 400,0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |

Tabla A IV.23.
Promedios de supervivientes. Ensayo de FENOL.

| mg/L C ₆ H ₅ OH | 24 h | | 48 h | | Promedio DesvEst |
|---------------------------------------|---------|------|---------|------|---------------------|
| | + Total | ± | + Total | ± | |
| 0,000 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 10,0 | 10,0 | 0,0 | 8,8 | 1,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,84 | 1,73 | |
| 25,0 | 10,0 | 0,0 | 6,2 | 1,2 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,84 | 0,84 | |
| 50,0 | 10,0 | 0,0 | 5,0 | 0,6 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,71 | 0,89 | |
| 100,0 | 9,0 | 1,4 | 4,2 | 2,8 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 1,14 | 1,10 | 1,48 | |
| 150,0 | 8,8 | 2,4 | 2,0 | 1,2 | Promedio DesvEst |
| | 1,30 | 1,67 | 1,41 | 1,30 | |
| 200,0 | 7,6 | 4,4 | 1,4 | 1,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,55 | 1,67 | 0,55 | 0,71 | |
| 250,0 | 4,8 | 3,8 | 0,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,84 | 0,84 | 0,00 | 0,00 | |
| 300,0 | 3,2 | 2,8 | 0,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,45 | 0,45 | 0,00 | 0,00 | |
| 350,0 | 0,6 | 0,6 | 0,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,89 | 0,89 | 0,00 | 0,00 | |
| 400,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |

+ Total: Número total de supervivientes; ±: Número de organismos que presentan un descenso en la capacidad natatoria

Variación del número de supervivientes



Las concentraciones incluidas en la zona interior del gráfico muestran los valores de LC₅₀ obtenidos mediante el método de interpolación gráfica

Tabla A IV.24.
Resultados obtenidos mediante el método PROBIT

| Ensayo de 24 h | Concentración estimada de FENOL (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|--|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 96,741 | 5,262 | 153,181 |
| LC/EC 5,00 | 128,078 | 15,639 | 182,879 |
| LC/EC 10,00 | 148,747 | 27,776 | 202,276 |
| LC/EC 15,00 | 164,551 | 40,725 | 217,605 |
| LC/EC 50,00 | 252,146 | 168,986 | 359,945 |
| LC/EC 85,00 | 386,370 | 294,593 | 1417,146 |
| LC/EC 90,00 | 427,421 | 317,577 | 2073,512 |
| LC/EC 95,00 | 496,398 | 351,864 | 3676,418 |
| LC/EC 99,00 | 657,193 | 420,687 | 10910,572 |

χ^2 calculado=87,553; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados hay que interpretarlos con precaución

| Ensayo de 48 h | Concentración estimada de FENOL (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|--|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 3,385 | 0,805 | 7,495 |
| LC/EC 5,00 | 7,236 | 2,354 | 13,644 |
| LC/EC 10,00 | 10,850 | 4,154 | 18,857 |
| LC/EC 15,00 | 14,261 | 6,078 | 23,522 |
| LC/EC 50,00 | 45,290 | 28,685 | 63,413 |
| LC/EC 85,00 | 143,825 | 102,970 | 224,752 |
| LC/EC 90,00 | 189,044 | 132,255 | 319,401 |
| LC/EC 95,00 | 283,451 | 187,841 | 548,477 |
| LC/EC 99,00 | 605,924 | 350,697 | 1564,032 |

χ^2 calculado=23,152; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados hay que interpretarlos con precaución

4. ENSAYOS CON BACTERIAS LUMINISCENTES

4.1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Condiciones del ensayo LUMISTOX
- N° de réplicas: 2 para cada concentración y control
- Duración del ensayo: 30 minutos
- Respuesta observada: luminiscencia de las bacterias

ORGANISMOS DE ENSAYO

- Bacterias luminiscentes proporcionadas por la marca comercial *Dr. Lange* para el ensayo de LUMISTOX

RESULTADOS OBTENIDOS

- Inhibición de la luminiscencia a t=15 min, y t=30 min.

4.2. RESULTADOS OBTENIDOS

Tabla IV.25

Resultados obtenidos en el ensayo de bacterias luminiscentes y FENOL

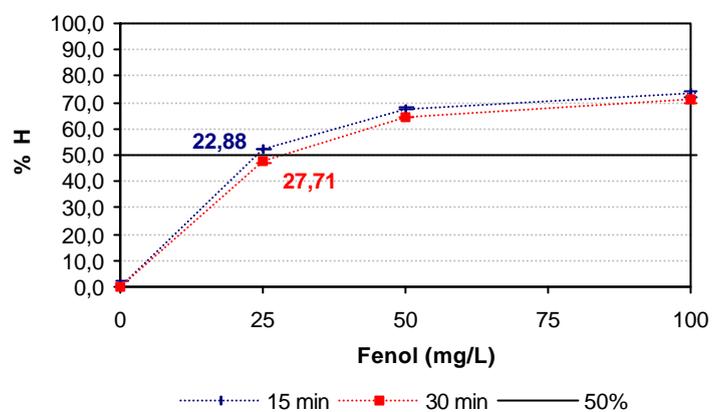
| mg/L | Luminiscencia | | | t=15 min | | | t=30 min | | |
|---------|---------------|-------|-------|----------|------|----------|----------|------|-------|
| | t=0 | t=15 | t=30 | Icorr | %H | Gamma | Icorr | %H | Gamma |
| 500 | 1871 | 324,6 | 327,3 | 1692,3 | 80,8 | 4,2 | 1698,4 | 80,7 | 4,2 |
| | 1814 | 295,2 | 299,5 | 1640,7 | 82,0 | 4,6 | 1646,7 | 81,8 | 4,5 |
| 250 | 1777 | 301,3 | 306,8 | 1607,3 | 81,3 | 4,3 | 1613,1 | 81,0 | 4,3 |
| | 1950 | 335,1 | 339,3 | 1763,7 | 81,0 | 4,3 | 1770,1 | 80,8 | 4,2 |
| 200 | 1929 | 367,7 | 386,4 | 1744,7 | 78,9 | 3,7 | 1751,1 | 77,9 | 3,5 |
| | 2020 | 369,2 | 387,8 | 1827,1 | 79,8 | 3,9 | 1833,7 | 78,9 | 3,7 |
| 150 | 1926 | 371,7 | 400,4 | 1742,0 | 78,7 | 3,7 | 1748,4 | 77,1 | 3,4 |
| | 2083 | 382,3 | 478,9 | 1884,0 | 79,7 | 3,9 | 1890,9 | 74,7 | 2,9 |
| 125 | 2023 | 423,5 | 512,5 | 1829,8 | 76,9 | 3,3 | 1836,4 | 72,1 | 2,6 |
| | 2223 | 421,9 | 547,5 | 2010,7 | 79,0 | 3,8 | 2018,0 | 72,9 | 2,7 |
| 100 | 2025 | 503,7 | 549,3 | 1831,6 | 72,5 | 2,6 | 1838,2 | 70,1 | 2,3 |
| | 2109 | 495,3 | 544,4 | 1907,6 | 74,0 | 2,9 | 1914,5 | 71,6 | 2,5 |
| 50 | 2082 | 615,2 | 675,7 | 1883,1 | 67,3 | 2,1 | 1890,0 | 64,2 | 1,8 |
| | 2109 | 614,8 | 687,3 | 1907,6 | 67,8 | 2,1 | 1914,5 | 64,1 | 1,8 |
| 25 | 2100 | 906,8 | 997,9 | 1899,4 | 52,3 | 1,1 | 1906,3 | 47,7 | 0,9 |
| | 2108 | 912,2 | 1010 | 1906,7 | 52,2 | 1,1 | 1913,6 | 47,2 | 0,9 |
| Control | 2245 | 2065 | 2059 | 2030,6 | -1,7 | 0,0 | 2037,9 | -1,0 | 0,0 |
| | 2165 | 1925 | 1945 | 1958,2 | 1,7 | 0,0 | 1965,3 | 1,0 | 0,0 |
| | | | | | | KF=0,904 | KF=0,908 | | |

Tabla IV.26

Promedio de los valores de %H del ensayo de FENOL

| | mg/L C ₆ H ₅ OH | | | | | | | | | |
|----------|---------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| | Control | 25,0 | 50,0 | 100,0 | 125,0 | 150,0 | 200,0 | 250,0 | 500,0 | |
| t=15 min | 0,00 | 52,21 | 67,55 | 73,27 | 77,94 | 79,19 | 79,36 | 81,13 | 81,41 | Promedio |
| | 2,40 | 0,07 | 0,31 | 1,09 | 1,53 | 0,74 | 0,61 | 0,18 | 0,84 | DesvEst |
| t=30 min | 0,00 | 47,44 | 64,17 | 70,84 | 72,48 | 75,89 | 78,39 | 80,91 | 81,27 | Promedio |
| | 1,46 | 0,31 | 0,10 | 1,02 | 0,55 | 1,72 | 0,65 | 0,11 | 0,77 | DesvEst |

Variación del porcentaje de inhibición con la concentración de ensayo



Las concentraciones incluidas en la zona interior del gráfico muestran los valores de LC_{50} obtenidos mediante el método de interpolación gráfica.

Tabla A IV.27.
Valores de $EC(p)$ calculados mediante interpolación gráfica

| Fenol (mg/L) | $t=15 \text{ min}$ | $t=30 \text{ min}$ |
|--------------|--------------------|--------------------|
| EC_5 | 2,28 | 2,77 |
| EC_{25} | 11,43 | 13,85 |
| EC_{50} | 22,88 | 27,71 |

5. OBJETIVOS DE CALIDAD DEL FENOL. TABLAS DE CÁLCULO. RESULTADOS

Tabla A IV.28. Tabla resumen de los resultados de toxicidad más sensibles (Fact. Seg.=100)

| Resumen de resultados más sensibles de cada grupo de organismos | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos del presente estudio | | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos de toxicidad en agua de mar | | | Valor mínimo obtenidos a partir de la base de datos de toxicidad acuática | | |
|---|---------------------------|---|-------|-------|--|-------|--------|---|-------|---------|
| | | Nº datos | mg/L | x FS | Nº datos | mg/L | x FS | Nº datos | mg/L | x FS |
| ,Microalgas | NOEC (≤ 96 h) | 7 | 50,0 | 0,5 | 7 | 50,0 | 0,5 | 7 | 50,0 | 0,5 |
| | NOEC (8 d) | | | | 1 | 0,5 | 0,05 | 1 | 0,5 | 0,05 |
| | LOEC (≤ 96 h) | 10 | 50,0 | 0,5 | 10 | 50,0 | 0,5 | 12 | 50,0 | 0,5 |
| | LOEC (8 d) | | | | 1 | 5,0 | 0,5 | 1 | 5,0 | 0,5 |
| | IC ₅₀ (≤ 96 h) | 10 | 103,4 | 1,034 | 10 | 103,4 | 1,034 | 10 | 103,4 | 1,034 |
| Crustáceos | LOEC (≤ 96 h) | | | | 1 | 56 | 0,56 | 4 | 7 | 0,07 |
| | EC ₅₀ (≤ 96 h) | 2 | 45,3 | 0,453 | 2 | 25,0 | 0,25 | 3 | 25,0 | 0,25 |
| Bacterias | LOEC (≤ 96 h) | | | | 1 | 64 | 0,64 | 1 | 64 | 0,64 |
| | EC ₅₀ (≤ 96 h) | 2 | 22,9 | 0,229 | 2 | 22,9 | 0,229 | 2 | 22,9 | 0,229 |
| Otros invertebrados | LOEC (≤ 96 h) | | | | 2 | 52,63 | 0,5263 | 2 | 52,63 | 0,5263 |
| | LOEC (12 d) | | | | 1 | 55 | 5,5 | 1 | 55 | 5,5 |
| Peces | NOEC (≤ 96 h) | | | | | | | 1 | 1,8 | 0,018 |
| | NOEC (30 d) | | | | | | | 1 | 0,75 | 0,075 |
| | LOEC (≤ 96 h) | | | | | | | 1 | 0,001 | 0,00001 |
| | LOEC (12 d) | | | | | | | 15 | 0,08 | 0,008 |
| | EC ₅₀ (≤ 96 h) | | | | | | | 15 | 0,71 | 0,0071 |

Tabla A IV.29. Valores ecotoxicológicos obtenidos a partir de los valores L(E)C₅₀

| Valor guía obtenido a partir de los valores de L(E)C ₅₀ | Grupo de organismos | Tipo de Respuesta (Aguda o Crónica) | n _i , N | w _i = n _i /N | q _i = Conc· F S | w _i x q _i | Valor Guía = $\sum_{i=1}^n q_i \cdot w_i$ |
|--|---------------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|---|
| Base de datos de toxicidad de este estudio | Algas | A | 10 | 0,7143 | 1,034 | 0,7386 | 0,8360 mg/L FENOL |
| | Crustáceos | A | 2 | 0,1429 | 0,453 | 0,0647 | |
| | Bacterias | A | 2 | 0,1429 | 0,229 | 0,0327 | |
| | N total de datos | | 14 | | | | |
| Base de datos de toxicidad en agua de mar | Algas | A | 10 | 0,6667 | 1,034 | 0,6893 | 0,7699 mg/L FENOL |
| | Crustáceos | A | 3 | 0,2000 | 0,25 | 0,0500 | |
| | Bacterias | A | 2 | 0,1333 | 0,229 | 0,0305 | |
| | N total de datos | | 15 | | | | |
| Base de toxicidad acuática | Algas | A | 10 | 0,6250 | 1,0340 | 0,6463 | 0,7222 mg/L FENOL |
| | Crustáceos | A | 3 | 0,1875 | 0,2500 | 0,0469 | |
| | Bacterias | A | 2 | 0,1250 | 0,2290 | 0,0286 | |
| | Peces | A | 1 | 0,0625 | 0,0071 | 0,0004 | |
| | N total de datos | | 16 | | | | |

Tabla A IV.30. Valores ecotoxicológicos obtenidos a partir de los valores NOEC/LOEC

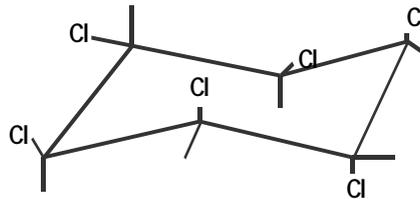
| Valor guía obtenido a partir de los valores NOEC/LOEC | Grupo de organismos | Tipo de Respuesta (Aguda o Crónica) | n_i, N | $w_i = n_i/N$ | $q_i = \text{Conc} \cdot F \cdot S$ | $w_i \times q_i$ | Valor Guía = $\sum_{i=1}^n q_i \cdot w_i$ |
|---|---------------------|-------------------------------------|----------|---------------|-------------------------------------|------------------|---|
| Base de datos de toxicidad de este estudio | Algas | A (NOEC) | 7 | 0,4118 | 0,5 | 0,2059 | 0,500 mg/L L FENOL |
| | Algas | A (LOEC) | 10 | 0,5882 | 0,5 | 0,2941 | |
| | N total de datos | | | 20 | | | |
| Base de datos de toxicidad en agua de mar | Algas | A (LOEC) | 7 | 0,2917 | 0,5 | 0,1458 | 0,7001 mg/L FENOL |
| | Algas | C (NOEC) | 1 | 0,0417 | 0,05 | 0,0021 | |
| | Algas | A (LOEC) | 10 | 0,4167 | 0,5 | 0,2083 | |
| | Algas | C (LOEC) | 1 | 0,0417 | 0,5 | 0,0208 | |
| | Crustáceos | A (LOEC) | 1 | 0,0417 | 0,56 | 0,0233 | |
| | Bacterias | A (LOEC) | 1 | 0,0417 | 0,64 | 0,0267 | |
| | Otros invertebrados | A (LOEC) | 2 | 0,0833 | 0,5263 | 0,0439 | |
| | Otros invertebrados | C (LOEC) | 1 | 0,0417 | 5,5 | 0,2292 | |
| N total de datos | | | 24 | | | | |
| Base de toxicidad acuática | Algas | A (NOEC) | 7 | 0,2500 | 0,5000 | 0,1250 | 0,8407 mg/L FENOL |
| | Algas | C (NOEC) | 1 | 0,0357 | 0,0500 | 0,0018 | |
| | Algas | A (LOEC) | 12 | 0,4286 | 0,5000 | 0,2143 | |
| | Algas | C (LOEC) | 1 | 0,0357 | 0,5000 | 0,0179 | |
| | Crustáceos | A (LOEC) | 4 | 0,1429 | 0,0700 | 0,0100 | |
| | Bacterias | A (LOEC) | 1 | 0,0357 | 0,6400 | 0,0229 | |
| | Otros invertebrados | A (LOEC) | 2 | 0,0714 | 0,5263 | 0,0376 | |
| | Otros invertebrados | C (LOEC) | 1 | 0,0357 | 5,5000 | 0,1964 | |
| | peces | A (NOEC) | 1 | 0,0357 | 1,8000 | 0,0643 | |
| | peces | C (NOEC) | 4 | 0,1429 | 0,7500 | 0,1071 | |
| | peces | A (LOEC) | 15 | 0,5357 | 0,0010 | 0,0005 | |
| | peces | C (LOEC) | 15 | 0,5357 | 0,0800 | 0,0429 | |
| N total de datos | | | 64 | | | | |

ANEXO V. GAMMA-HEXACLOROCICLOHEXANO (LINDANO)

1. DATOS DE REFERENCIA

1.1. PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS

- Insecticida organoclorado
- Suministro: SIGMA
- Nombre del producto: Hexacloruro de benzeno, BHC, HCCH, HCH, TBH, clorán
- Número del producto: 58899
- Fórmula empírica: $C_6H_6Cl_6$
- Fórmula estructural:



- Peso molecular: 290,85 g/mol
- Apariencia: polvo blanco
- Solubilidad en agua (20°C): 1-1000 mg/L
- Composición: Gamma isómero que representa al menos el 99% de una mezcla de 6 isómeros

1.2. DATOS DE TOXICIDAD DE REFERENCIA

La siguiente tabla muestra algunos resultados de toxicidad obtenidos de la bibliografía:

Tabla A V.1a.
Datos de toxicidad del Lindano en algunos grupos de organismos. Algas

| Especies | Medio | Tiempo Exposición (h) | Expresión de toxicidad | Lindano (mg/L) | Referencia |
|---------------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|----------------|--------------------------------|
| <i>Chaetoceros gracilllis</i> | Agua salada | 72 | EC50 | 5,34 | Garrido <i>et al.</i> , (2000) |
| <i>Dunaliella salina</i> | Agua salada | 72 | EC50 | 4,66 | Garrido <i>et al.</i> , (2000) |
| <i>Isochrysis aff. galban</i> | Agua salada | 72 | EC50 | 2,03 | Garrido <i>et al.</i> , (2000) |
| <i>Mycrocystis aureginosa</i> | Agua salada | crónica | NOEL | 0,3 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Nannochloropsis gaditana</i> | Agua salada | 72 | EC50 | 11,47 | Garrido <i>et al.</i> , (2000) |
| <i>Tetraselmis chuii</i> | Agua salada | 72 | EC50 | 1,92 | Garrido <i>et al.</i> , (2000) |

Tabla A V.1b.
Datos de toxicidad del Lindano en algunos grupos de organismos. Otros invertebrados

| Especies | Medio | Tiempo Exposición (h) | Expresión de toxicidad | Lindano (mg/L) | Referencia |
|----------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|----------------|--------------------------------|
| <i>Limnaea stagnalis</i> | Agua dulce | 48 h | EC50 | 7,3 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Crassostrea gigas</i> | Agua salada | crónica | Histología | 0,016 | Garrido <i>et al.</i> , (2000) |
| <i>Scrobicularia plana</i> | Agua salada | crónica | Histología | 0,016 | Garrido <i>et al.</i> , (2000) |

Tabla A V.1c.
Datos de toxicidad del Lindano en algunos grupos de organismos. Peces

| Especies | Medio | Tiempo Exposición (h) | Expresión de toxicidad | Lindano (mg/L) | Referencia |
|------------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|----------------|----------------------------|
| <i>Anguilla rostrata</i> | Agua salada | 96 h | EC50 | 0,056 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Baetis rhodani</i> | Agua dulce | 35 | NOEC | 0,04 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Baetis rhodani</i> | Agua dulce | 35 | LOEC | 0,08 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Baetis rhodani</i> | Agua dulce | 35 | NOEC | 0,1 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Baetis rhodani</i> | Agua dulce | 35 | EC50 | 0,118 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Baetis rhodani</i> | Agua dulce | 35 | LOEC | 0,13 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Colisa fasciata</i> | Agua dulce | 96 h | TLm | 0,41 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Colisa fasciata</i> | Agua dulce | crónica | TLm | 0,6 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Colisa fasciata</i> | Agua dulce | 96 h | TLm | 0,64 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Colisa fasciata</i> | Agua dulce | crónica | TLm | 0,87 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> | Agua salada | 96 h | EC50 | 0,1039 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Cyprinus carpio</i> | Agua dulce | 96 h | EC50 | 0,09 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Fundulus heteroclitus</i> | Agua salada | 96 h | EC50 | 0,06 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Fundulus majalis</i> | Agua salada | 96 h | EC50 | 0,028 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Leiostomus xanthurus</i> | Agua dulce | 55 | NOEC | 0,0091 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Leiostomus xanthurus</i> | Agua dulce | 55 | LOEC | 0,0125 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Leiostomus xanthurus</i> | Agua dulce | 8 | EC50 | 0,058 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Leuciscus idus</i> | Agua dulce | 48 h | EC50 | 0,010 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Leuciscus idus</i> | Agua dulce | 48 h | EC100 | 0,02 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Menidia menidia</i> | Agua salada | 96 h | EC50 | 0,009 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Mugil cephalus</i> | Agua salada | 96 h | EC50 | 0,066 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Agua salada | 24 h | EC50 | 0,037 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Agua salada | 96 h | EC50 | 0,013 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Agua salada | 48 h | TLm | 1,05 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Oncorhynchus mykiss</i> | Agua salada | 48 h | TLm | 1,05 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Perca flavescens</i> | Agua salada | 96 h | EC50 | 0,068 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Perca fluviatilis</i> | Agua dulce | 96 h | EC50 | 0,068 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 300 | NOEC | 0,0091 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 300 | LOEC | 0,0235 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 11 | EC50 | 0,0691 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | crónica | TLm | 0,069 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 261 | NOEC | 0,0088 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 261 | LOEC | 0,0166 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,0443 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Sparus aurata</i> | Agua salada | crónica | Histología | 0,016 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |

Tabla A V.1d.
Datos de toxicidad del Lindano en algunos grupos de organismos. Crustáceos

| Especies | Medio | Tiempo Exposición (h) | Expresión de toxicidad | Lindano (mg/L) | Referencia |
|-----------------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|----------------|--------------------------------|
| <i>Asellus aquaticus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,375 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Asellus aquaticus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,375 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Asellus brevicaudus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,01 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Baetis rhodani</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,054 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Baetis rhodani</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,054 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Baetis rhodani</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,185 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Ceriodaphnia dubia</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,235 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Ceriodaphnia dubia</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,235 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Ceriodaphnia dubia</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,33 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Chironomus sp.</i> | Agua dulce | 60 d | NOEC | 0,0022 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Chironomus sp.</i> | Agua dulce | 60 d | LOEC | 0,005 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Chironomus sp.</i> | Agua dulce | 60 d | EC50 | 0,0443 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Chironomus sp.</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,207 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia</i> | Agua dulce | crónica | EC50 | 6,442 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia</i> | Agua dulce | crónica | EC50 | 13,054 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia magna</i> | Agua dulce | 64 | NOEC | 0,011 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia magna</i> | Agua dulce | 64 | LOEC | 0,019 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia magna</i> | Agua dulce | 24 | EC0 | 0,04 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,485 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia magna</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,485 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia magna</i> | Agua dulce | 24 | EC100 | 0,5 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia magna</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 1,25 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia pulex</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,46 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia pulex</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,46 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Gammarus pulex</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,225 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Gammarus pulex</i> | Agua dulce | 120 | LOEC | 0,0043 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Gammarus pulex</i> | Agua dulce | 120 | LOEC | 0,0086 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Gammarus pulex</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,039 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Gammarus pulex</i> | Agua dulce | 120 | EC50 | 0,0691 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Hydropsyche angustipennis</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,33 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Hydropsyche angustipennis</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,33 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Leuctra moselyi</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,15 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Protonemura meyeri</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,13 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Simocephalus serrulatus</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,52 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Artemia salina</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 0,5 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Artemia salina</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 0,5 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Artemia salina</i> | Agua salada | 48 | EC50 | 1,4 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Artemia salina</i> | Agua salada | 24 | EC50 | 2,38 | Garrido <i>et al.</i> , (2000) |
| <i>Gammarus lacustris</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 0,048 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Gammarus pseudolimnaeus</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 0,01 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Gammarus pseudolimnaeus</i> | Agua salada | 48 | EC50 | 0,039 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Gammarus pulex</i> | Agua salada | 48 | EC50 | 0,03 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Mercenaria mercenaria</i> | Agua salada | 48 | EC50 | 10 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Mercenaria mercenaria</i> | Agua salada | crónica | | 10 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Mysidopsis bahia</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 0,00628 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Pagurus longicarpus</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 0,005 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Palaemonetes macrodactylus</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 0,0092 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Palaemonetes macrodactylus</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 0,0125 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Palaemonetes pugio</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 0,0044 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Palaemonetes vulgaris</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 0,01 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Penaeus aztecus</i> | Agua salada | 48 | EC50 | 0,0004 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Penaeus aztecus</i> | Agua salada | 24 | EC50 | 0,04 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Penaeus duorarum</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 0,00004 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Penaeus duorarum</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 0,00034 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |
| <i>Penaeus setiferus</i> | Agua salada | 24 | EC50 | 0,035 | Rammamorthy ⁽¹⁾ |

¹ Referencias recogidas en los documentos indicados pero no pertenecientes a estos autores

2. ENSAYOS DE MICROALGAS MARINAS

RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Volumen de los viales de ensayo: 15 mL
- Volumen de solución de ensayo: 4 mL
- Agua de dilución: mezcla acetona+agua de mar sintética (acetona al 1,25% (v/v))
- Medio nutriente adicional: si, medio f/2
- Temperatura de ensayo: $20 \pm 0,1$ °C
- Iluminación: constante, 11000 lux
- Aireación: diaria -de forma manual-
- Duración del ensayo: 10 días (+ 10 para el estudio de la concentración alguistática y alguicida)
- Medidas de biomasa: turbidez, a $\lambda = 690$ nm

MICROALGAS ENSAYADAS

- *Nannochloropsis gaditana*
- *Isochrysis galbana*
- *Dunaliella salina*
- *Chaetoceros gracilis*
- *Tetraselmis chuii*

RESULTADOS OBTENIDOS

- Valores de biomasa (Abs, 690 nm) de cada tratamiento
- Valores experimentales de NOEC y LOEC
- Valores experimentales de inhibición calculados a partir del ICp programa (Las indicaciones inferiores de las tablas (*) y (**)) están referidas a indicaciones realizadas por el programa
- Concentraciones alguistáticas y alguicidas experimentales

2.1. *Nannochloropsis gaditana*

Tabla A V.2.

Evolución de la biomasa de *Nannochloropsis gaditana*. Ensayo de LINDANO.

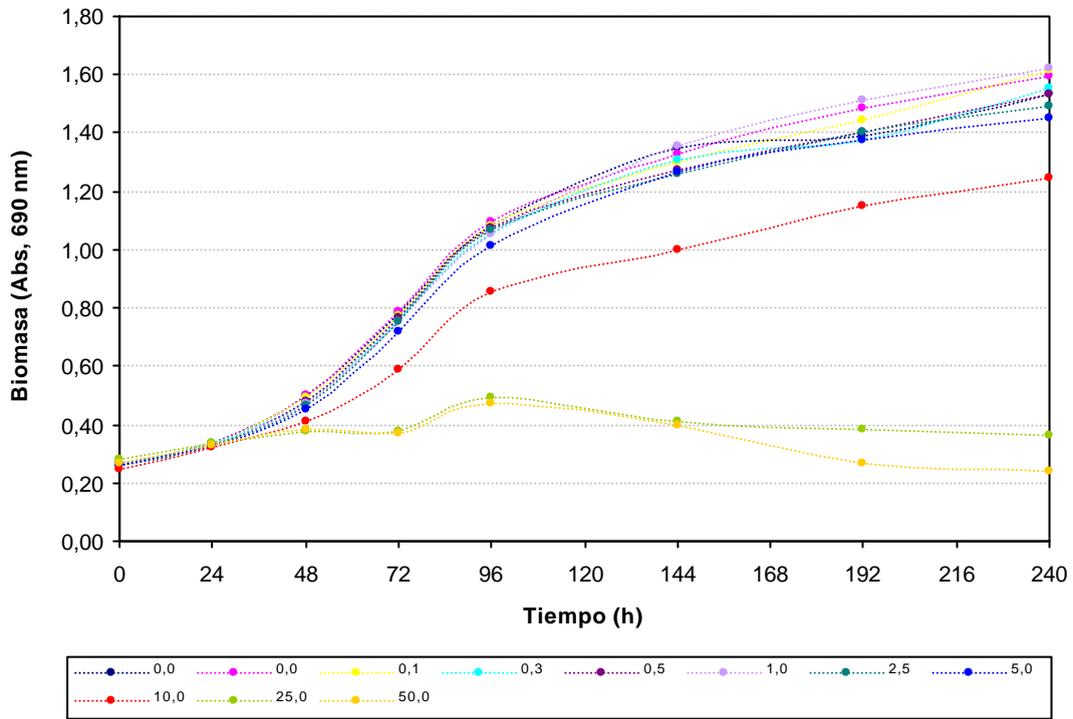
| t(d) | <i>N. gaditana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | Abs´ = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | |
|------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| 0,00 | 0,262 | 0,355 | 0,552 | 0,815 | 1,132 | | | | 0,000 | 0,093 | 0,290 | 0,553 | 0,870 | | | |
| | 0,275 | 0,340 | 0,492 | 0,781 | 1,074 | 1,350 | 1,391 | 1,536 | 0,000 | 0,065 | 0,217 | 0,506 | 0,799 | 1,075 | 1,116 | 1,261 |
| | 0,263 | 0,320 | 0,449 | 0,738 | 1,038 | | | | 0,000 | 0,057 | 0,186 | 0,475 | 0,775 | | | |
| 0,01 | 0,267 | 0,361 | 0,557 | 0,849 | 1,166 | | | | 0,000 | 0,094 | 0,290 | 0,582 | 0,899 | | | |
| | 0,273 | 0,341 | 0,510 | 0,791 | 1,099 | 1,325 | 1,483 | 1,596 | 0,000 | 0,068 | 0,237 | 0,518 | 0,826 | 1,052 | 1,210 | 1,323 |
| | 0,253 | 0,311 | 0,433 | 0,713 | 1,018 | | | | 0,000 | 0,058 | 0,180 | 0,460 | 0,765 | | | |
| 0,10 | 0,266 | 0,352 | 0,541 | 0,843 | 1,144 | | | | 0,000 | 0,086 | 0,275 | 0,577 | 0,878 | | | |
| | 0,258 | 0,328 | 0,478 | 0,778 | 1,062 | 1,300 | 1,442 | 1,615 | 0,000 | 0,070 | 0,220 | 0,520 | 0,804 | 1,042 | 1,184 | 1,357 |
| | 0,264 | 0,327 | 0,453 | 0,709 | 1,030 | | | | 0,000 | 0,063 | 0,189 | 0,445 | 0,766 | | | |
| 0,25 | 0,268 | 0,358 | 0,524 | 0,813 | 1,115 | | | | 0,000 | 0,090 | 0,256 | 0,545 | 0,847 | | | |
| | 0,258 | 0,322 | 0,470 | 0,757 | 1,029 | 1,304 | 1,375 | 1,556 | 0,000 | 0,064 | 0,212 | 0,499 | 0,771 | 1,046 | 1,117 | 1,298 |
| | 0,278 | 0,334 | 0,447 | 0,706 | 1,017 | | | | 0,000 | 0,056 | 0,169 | 0,428 | 0,739 | | | |
| 0,50 | 0,279 | 0,356 | 0,540 | 0,837 | 1,142 | | | | 0,000 | 0,077 | 0,261 | 0,558 | 0,863 | | | |
| | 0,243 | 0,317 | 0,469 | 0,757 | 1,049 | 1,270 | 1,406 | 1,530 | 0,000 | 0,074 | 0,226 | 0,514 | 0,806 | 1,027 | 1,163 | 1,287 |
| | 0,260 | 0,314 | 0,437 | 0,699 | 1,023 | | | | 0,000 | 0,054 | 0,177 | 0,439 | 0,763 | | | |
| 1,00 | 0,242 | 0,332 | 0,505 | 0,788 | 1,095 | | | | 0,000 | 0,090 | 0,263 | 0,546 | 0,853 | | | |
| | 0,278 | 0,351 | 0,492 | 0,769 | 1,066 | 1,353 | 1,512 | 1,623 | 0,000 | 0,073 | 0,214 | 0,491 | 0,788 | 1,075 | 1,234 | 1,345 |
| | 0,255 | 0,306 | 0,423 | 0,704 | 1,002 | | | | 0,000 | 0,051 | 0,168 | 0,449 | 0,747 | | | |
| 2,5 | 0,272 | 0,349 | 0,512 | 0,807 | 1,119 | | | | 0,000 | 0,077 | 0,240 | 0,535 | 0,847 | | | |
| | 0,244 | 0,313 | 0,451 | 0,742 | 1,034 | 1,260 | 1,406 | 1,490 | 0,000 | 0,069 | 0,207 | 0,498 | 0,790 | 1,016 | 1,162 | 1,246 |
| | 0,270 | 0,327 | 0,441 | 0,707 | 1,058 | | | | 0,000 | 0,057 | 0,171 | 0,437 | 0,788 | | | |
| 5,0 | 0,245 | 0,321 | 0,454 | 0,737 | 1,012 | | | | 0,000 | 0,076 | 0,209 | 0,492 | 0,767 | | | |
| | 0,276 | 0,337 | 0,461 | 0,725 | 1,036 | 1,263 | 1,378 | 1,452 | 0,000 | 0,061 | 0,185 | 0,449 | 0,760 | 0,987 | 1,102 | 1,176 |
| | 0,266 | 0,327 | 0,439 | 0,694 | 0,995 | | | | 0,000 | 0,061 | 0,173 | 0,428 | 0,729 | | | |
| 10 | 0,246 | 0,332 | 0,425 | 0,626 | 0,965 | | | | 0,000 | 0,086 | 0,179 | 0,380 | 0,719 | | | |
| | 0,251 | 0,323 | 0,413 | 0,592 | 0,818 | 1,000 | 1,148 | 1,248 | 0,000 | 0,072 | 0,162 | 0,341 | 0,567 | 0,749 | 0,897 | 0,997 |
| | 0,249 | 0,300 | 0,389 | 0,550 | 0,787 | | | | 0,000 | 0,051 | 0,140 | 0,301 | 0,538 | | | |
| 25 | 0,275 | 0,346 | 0,376 | 0,374 | 0,494 | | | | 0,000 | 0,071 | 0,101 | 0,099 | 0,219 | | | |
| | 0,277 | 0,339 | 0,379 | 0,374 | 0,493 | 0,410 | 0,382 | 0,362 | 0,000 | 0,062 | 0,102 | 0,097 | 0,216 | 0,133 | 0,105 | 0,085 |
| | 0,280 | 0,323 | 0,367 | 0,375 | 0,500 | | | | 0,000 | 0,043 | 0,087 | 0,095 | 0,220 | | | |
| 50 | 0,288 | 0,359 | 0,405 | 0,385 | 0,476 | | | | 0,000 | 0,071 | 0,117 | 0,097 | 0,188 | | | |
| | 0,252 | 0,318 | 0,376 | 0,364 | 0,455 | 0,399 | 0,264 | 0,238 | 0,000 | 0,066 | 0,124 | 0,112 | 0,203 | 0,147 | 0,012 | -0,014 |
| | 0,270 | 0,318 | 0,366 | 0,369 | 0,483 | | | | 0,000 | 0,048 | 0,096 | 0,099 | 0,213 | | | |

Tabla A V.3.

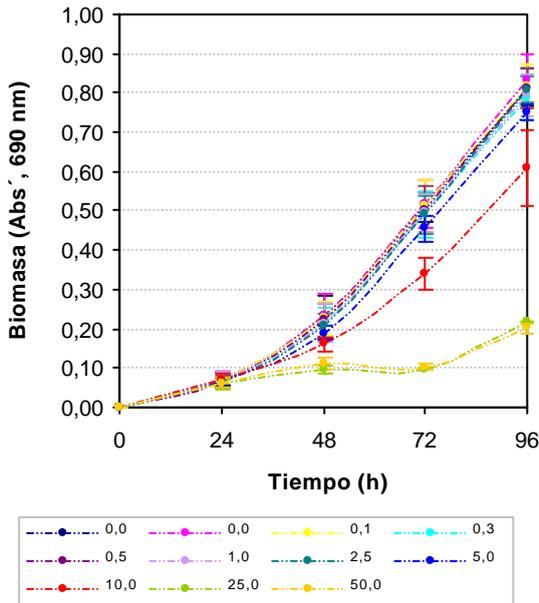
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs´)

| t (h) | mg/L LINDANO | | | | | | | | | | | Promedio |
|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| | 0,000 | 0,001 | 0,010 | 0,025 | 0,050 | 1,00 | 2,50 | 5,0 | 10 | 25 | 50 | |
| 24 | 0,072 | 0,073 | 0,073 | 0,070 | 0,068 | 0,071 | 0,068 | 0,066 | 0,070 | 0,059 | 0,062 | DesvEst |
| | 0,019 | 0,019 | 0,012 | 0,018 | 0,013 | 0,020 | 0,010 | 0,009 | 0,018 | 0,014 | 0,012 | |
| 48 | 0,231 | 0,236 | 0,228 | 0,212 | 0,221 | 0,215 | 0,206 | 0,189 | 0,160 | 0,097 | 0,112 | DesvEst |
| | 0,053 | 0,055 | 0,044 | 0,044 | 0,042 | 0,048 | 0,035 | 0,018 | 0,020 | 0,008 | 0,015 | |
| 72 | 0,511 | 0,520 | 0,514 | 0,491 | 0,504 | 0,495 | 0,490 | 0,456 | 0,341 | 0,097 | 0,103 | DesvEst |
| | 0,039 | 0,061 | 0,066 | 0,059 | 0,060 | 0,049 | 0,049 | 0,033 | 0,040 | 0,002 | 0,008 | |
| 96 | 0,815 | 0,830 | 0,816 | 0,786 | 0,811 | 0,796 | 0,808 | 0,752 | 0,608 | 0,218 | 0,201 | DesvEst |
| | 0,049 | 0,067 | 0,057 | 0,055 | 0,050 | 0,053 | 0,034 | 0,020 | 0,097 | 0,002 | 0,013 | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

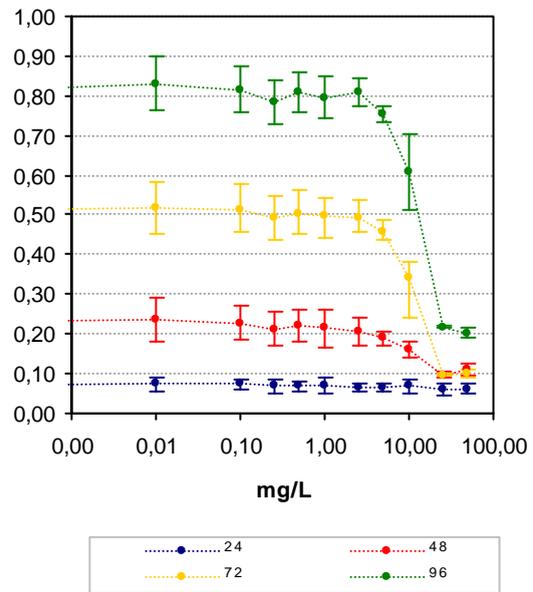


Tabla A V.4.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *N. gaditana* expuesta a diferentes concentraciones de LINDANO.

| <i>N. gaditana</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,942 | | 0,952 | | 0,934 | | 0,947 | |
| B calculado | 2,44 | | 8,98 | | 15,08 | | 17,10 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L LINDANO | t_i | p | t_i | p | t_i | p | t_i | p |
| 0,01 | -0,13 | 0,45926 | -0,15 | 0,46055 | -0,23 | 0,42311 | -0,36 | 0,38293 |
| 0,10 | -0,11 | 0,46121 | 0,10 | 0,47175 | -0,07 | 0,47752 | -0,03 | 0,48852 |
| 0,25 | 0,13 | 0,45839 | 0,60 | 0,33160 | 0,54 | 0,31993 | 0,68 | 0,26800 |
| 0,50 | 0,27 | 0,40574 | 0,31 | 0,40888 | 0,20 | 0,43118 | 0,09 | 0,46317 |
| 1,00 | 0,03 | 0,49204 | 0,52 | 0,35897 | 0,42 | 0,34025 | 0,44 | 0,33993 |
| 2,5 | 0,32 | 0,38126 | 0,81 | 0,26660 | 0,56 | 0,29502 | 0,15 | 0,43156 |
| 5,0 | 0,46 | 0,33075 | 1,35 | 0,13351 | 1,43 | 0,06774 | 1,48 | 0,05589 |
| 10,0 | 0,16 | 0,44991 | 2,28 | 0,04885 | 4,45 (*) | 0,00303 | 4,86 (*) | 0,01521 |
| 25,0 | 1,05 | 0,19793 | 4,33 (*) | 0,00630 | 10,81 | 0,00003 | 14,04 | 0,00002 |
| 50,0 | 0,81 | 0,24166 | 3,82 | 0,01029 | 10,66 | 0,00003 | 14,44 | 0,00002 |
| MSD | 0,033 | | 0,082 | | 0,101 | | 0,112 | |
| % reducción | 45,65 | | 35,47 | | 19,79 | | 13,77 | |
| <p><i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|------|-------|------|-------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| $t=72 h$ | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,901 | | 0,905 | | 0,921 | | 0,926 | | 0,931 | | 0,934 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 0,56 | | 0,60 | | 1,25 | | 1,48 | | 10,72 | | 15,08 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L LINDANO | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,01 | -0,19 | 0,42 | -0,19 | 0,42 | -0,20 | 0,42 | -0,20 | 0,42 | -0,22 | 0,42 | -0,23 | 0,42 |
| 0,10 | -0,06 | 0,48 | -0,06 | 0,48 | -0,06 | 0,48 | -0,06 | 0,48 | -0,07 | 0,48 | -0,07 | 0,48 |
| 0,25 | 0,45 | 0,32 | 0,46 | 0,32 | 0,48 | 0,32 | 0,49 | 0,32 | 0,51 | 0,32 | 0,54 | 0,32 |
| 0,50 | 0,17 | 0,43 | 0,17 | 0,43 | 0,18 | 0,43 | 0,18 | 0,43 | 0,19 | 0,43 | 0,20 | 0,43 |
| 1,00 | 0,35 | 0,34 | 0,35 | 0,34 | 0,37 | 0,34 | 0,38 | 0,34 | 0,40 | 0,34 | 0,42 | 0,34 |
| 2,5 | --- | --- | 0,47 | 0,30 | 0,49 | 0,30 | 0,50 | 0,30 | 0,53 | 0,30 | 0,56 | 0,30 |
| 5,0 | --- | --- | --- | --- | 1,27 | 0,07 | 1,30 | 0,07 | 1,37 | 0,07 | 1,43 | 0,07 |
| 10,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 4,03(*) | 0,00 | 4,25(*) | 0,00 | 4,45(*) | 0,00 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 10,32 | 0,00 | 10,81 | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 10,66 | 0,00 |
| MSD | 0,115 | | 0,115 | | 0,111 | | 0,109 | | 0,104 | | 0,101 | |
| % reducción | 22,53 | | 22,42 | | 21,74 | | 21,36 | | 20,42 | | 19,79 | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | | | | | |

Tabla A V.5.
Valores de ICp del ensayo de *N. gaditana* y LINDANO a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de LINDANO estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Inf. | Lim. Conf. Expandido Inf. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 2,5087 | -2,7580 | 0,0007 | 1,2045 | 4,4427 | 6,5702 | 1,3697 |
| | 25 | 8,0079 | 4,3811 | 6,2809 | 7,7427 | 9,2802 | 10,6798 | 0,7610 |
| | 50 | 15,1592 | 10,0628 | 12,7323 | 14,8464 | 16,3538 | 17,6680 | 0,9525 |
| | 75 | 23,1886 | 21,6600 | 22,4607 | 23,0391 | 23,5719 | 23,9935 | 0,2888 |
| | 95 | (*) | | | | | | |
| 96 | 5 | 3,4836 | -3,8233 | 0,0041 | 2,3775 | 4,9120 | 6,4833 | 1,6179 |
| | 25 | 9,6962 | 5,3700 | 7,6361 | 9,7018 | 12,7039 | 16,0124 | 1,3881 |
| | 50 | 17,5770 | 13,0326 | 15,4130 | 17,3537 | 18,9746 | 20,5119 | 0,9824 |
| | 75 | 43,7500 | (**) | (**) | 38,4927 | (**) | (**) | 5,9603 |
| | 95 | (*) | | | | | | |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

(*) No es posible realizar la interpolación lineal del conjunto de datos para este porcentaje de respuesta

(**) No es posible calcular límites de confianza

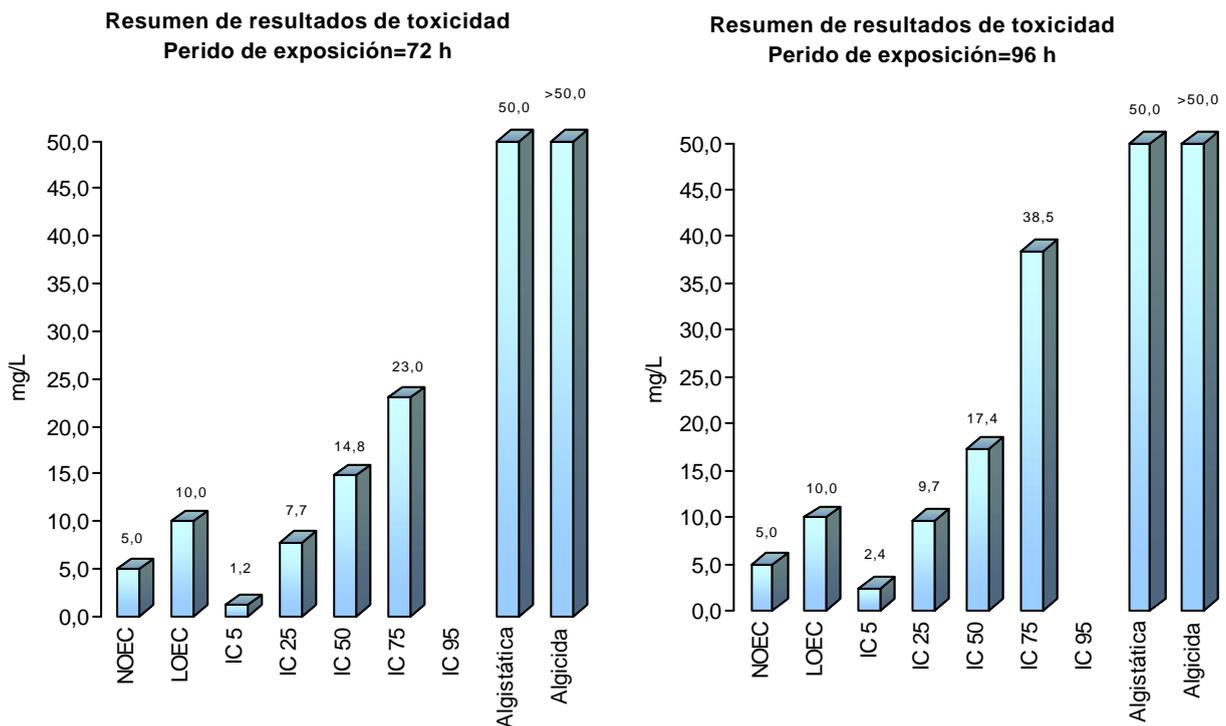
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de *lindano* ensayadas con *N. gaditana* (50, 25, 10 y 5 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa en todos los viales.

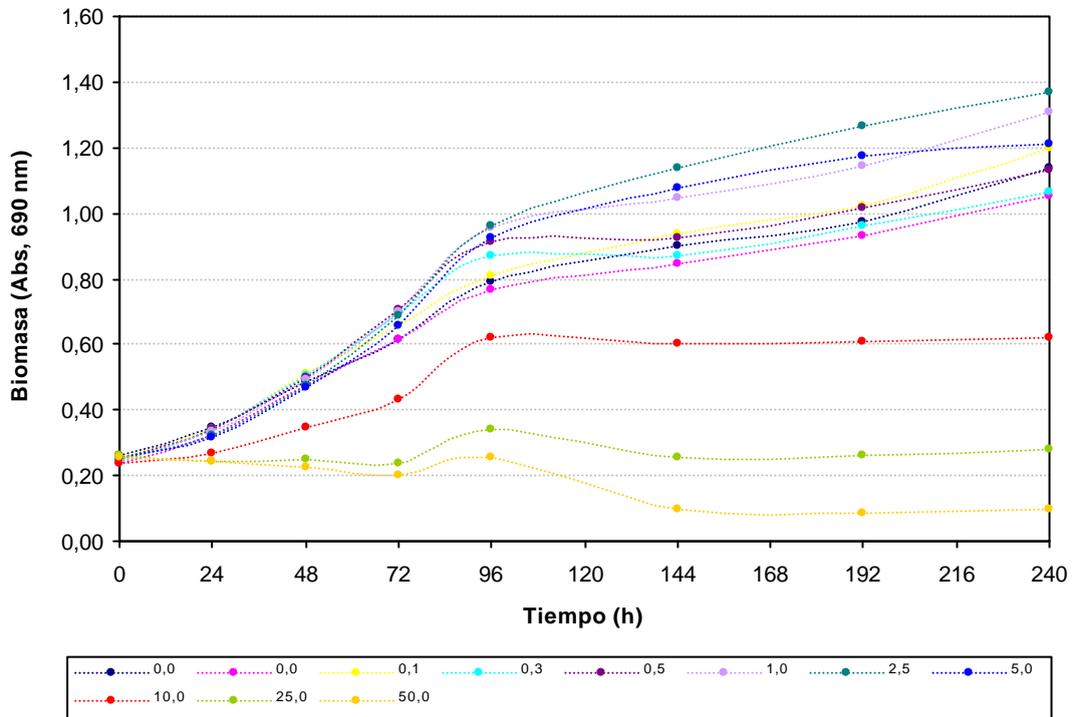
- Concentración alguistática= 50 mg/L
- Concentración alguicida= No determinado experimentalmente

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

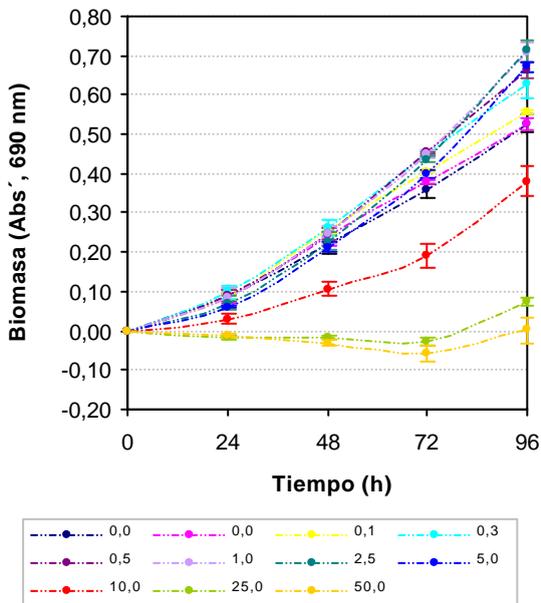
De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de *lindano* y *N. gaditana*.



Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

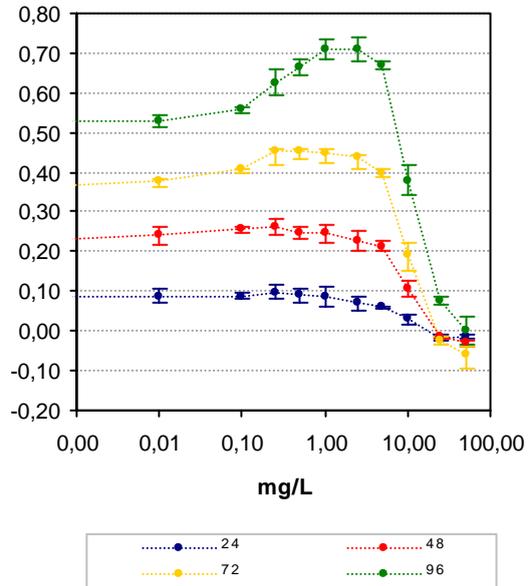


Tabla A V.8.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *I. galbana* expuesta a diferentes concentraciones de LINDANO.

| <i>I. galbana</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|--|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,959 | | 0,954 | | 0,967 | | 0,961 | |
| B calculado | 12,41 | | 7,19 | | 15,56 | | 8,63 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L LINDANO | t _i | p |
| 0,01 | 0,03 | 0,48894 | -1,18 | 0,21124 | -1,83 | 0,05681 | -0,02 | 0,49188 |
| 0,10 | -0,12 | 0,42046 | -2,24 | 0,04854 | -4,40 (***) | 0,00382 | -1,49 | 0,04170 |
| 0,25 | -0,89 | 0,21307 | -2,63 | 0,05374 | -8,42 (***) | 0,00047 | -4,94 (***) | 0,00603 |
| 0,50 | -0,24 | 0,40719 | -1,71 | 0,10771 | -8,59 (***) | 0,00031 | -6,81 (***) | 0,00075 |
| 1,00 | 0,09 | 0,47400 | -1,52 | 0,15459 | -8,27 (***) | 0,00057 | -9,05 (***) | 0,00036 |
| 2,5 | 1,49 | 0,09970 | -0,35 | 0,40591 | -7,09 (***) | 0,00078 | -9,24 (***) | 0,00049 |
| 5,0 | 2,38 | 0,00272 | 0,69 | 0,28425 | -3,75 (***) | 0,01106 | -7,20 (***) | 0,00025 |
| 10,0 | 5,08 (*) | 0,00126 | 8,07 (*) | 0,00146 | 14,65 (*) | 0,00061 | 7,41 (*) | 0,00205 |
| 25,0 | 9,34 | 0,00003 | 16,55 | 0,00004 | 33,81 | 0,00000 | 22,74 | 0,00000 |
| 50,0 | 8,92 | 0,00002 | 17,52 | 0,00003 | 36,76 | 0,00001 | 26,41 | 0,00001 |
| MSD | 0,030 | | 0,038 | | 0,030 | | 0,053 | |
| % reducción | 34,02 | | 17,12 | | 8,36 | | 9,97 | |
| <p><i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola).</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|---|-------------|------|-------------|------|-------------|------|------------|------|------------|------|------------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,976 | | 0,976 | | 0,985 | | 0,940 | | 0,951 | | 0,967 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 6,52 | | 6,81 | | 7,01 | | 14,64 | | 14,82 | | 15,56 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L LINDANO | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,01 | -2,79(***) | 0,06 | -2,90(***) | 0,06 | -2,80(***) | 0,06 | -1,90 | 0,06 | -1,94 | 0,06 | -1,83 | 0,06 |
| 0,10 | -6,71(***) | 0,00 | -6,96(***) | 0,00 | -6,72(***) | 0,00 | -4,57(***) | 0,00 | -4,67(***) | 0,00 | -4,40(***) | 0,00 |
| 0,25 | -12,83(***) | 0,00 | -13,31(***) | 0,00 | -12,85(***) | 0,00 | -8,75(***) | 0,00 | -8,93(***) | 0,00 | -8,42(***) | 0,00 |
| 0,50 | -13,10(***) | 0,00 | -13,59(***) | 0,00 | -13,12(***) | 0,00 | -8,93(***) | 0,00 | -9,12(***) | 0,00 | -8,59(***) | 0,00 |
| 1,00 | -12,61(***) | 0,00 | -13,08(***) | 0,00 | -12,62(***) | 0,00 | -8,59(***) | 0,00 | -8,77(***) | 0,00 | -8,27(***) | 0,00 |
| 2,5 | --- | --- | -11,21(***) | 0,00 | -10,82(***) | 0,00 | -7,36(***) | 0,00 | -7,52(***) | 0,00 | -7,09(***) | 0,00 |
| 5,0 | --- | --- | --- | --- | -5,73(***) | 0,01 | -3,90(***) | 0,01 | -3,98v | 0,01 | -3,75(***) | 0,01 |
| 10,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 15,22(*) | 0,00 | 15,54(*) | 0,00 | 14,65(*) | 0,00 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 35,88 | 0,00 | 33,81 | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 36,76 | 0,00 |
| MSD | 0,019 | | 0,018 | | 0,019 | | 0,028 | | 0,028 | | 0,030 | |
| % reducción | 5,19 | | 5,07 | | 5,31 | | 7,87 | | 7,76 | | 8,36 | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) ***La media para esta concentración es significativamente mayor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | | | | | |

Tabla A V.9.
Valores de ICp del ensayo de *I. galbana* y LINDANO a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de LINDANO estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf | Valor medio | Lim. Conf. Original. Inf | Lim. Conf. Expandido Inf | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 5,0247 | 3,3750 | 4,2391 | 4,9128 | 5,2628 | 5,5248 | 0,2870 |
| | 25 | 7,0402 | 6,4287 | 6,7490 | 7,0506 | 7,3924 | 7,7797 | 0,1653 |
| | 50 | 9,5597 | 8,2885 | 8,9544 | 9,6115 | 10,6997 | 11,9536 | 0,3818 |
| | 75 | 16,7820 | 13,3464 | 15,1460 | 16,7157 | 17,8669 | 19,0603 | 0,6501 |
| | 95 | 23,3564 | 22,6773 | 23,0330 | 23,3557 | 23,5714 | 23,8080 | 0,1264 |
| 96 | 5 | 5,6388 | 5,4621 | 5,5547 | 5,6427 | 5,7480 | 5,8681 | 0,0471 |
| | 25 | 8,1940 | 7,2974 | 7,7671 | 8,2152 | 8,7396 | 9,3396 | 0,2430 |
| | 50 | 13,3294 | 9,9783 | 11,7336 | 13,2951 | 14,5461 | 15,8846 | 0,7112 |
| | 75 | 20,9905 | 19,7640 | 20,4065 | 20,9977 | 21,5192 | 22,1008 | 0,2940 |
| | 95 | 39,7753 | (**) | (**) | 41,0809 | (**) | (**) | 2,3244 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

(**) No es posible calcular límites de confianza

CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

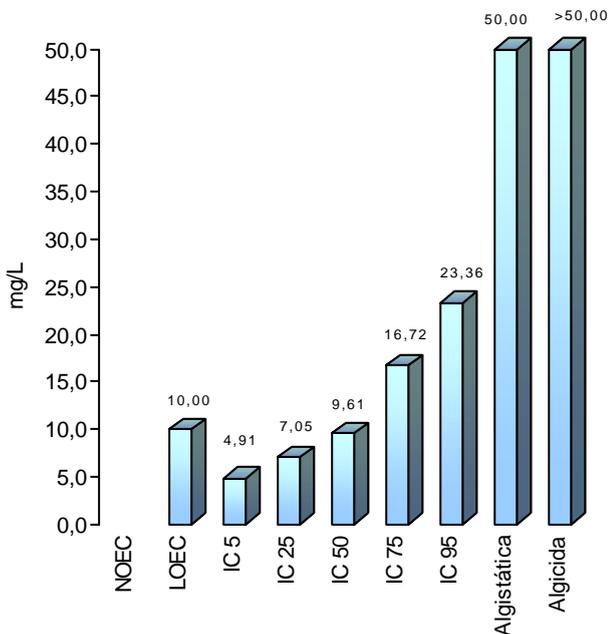
Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de *lindano* ensayadas con *I. galbana* (50, 25, 10 y 5 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa en todos los viales.

- Concentración alguistática= 50 mg/L
- Concentración alguicida= No determinado experimentalmente

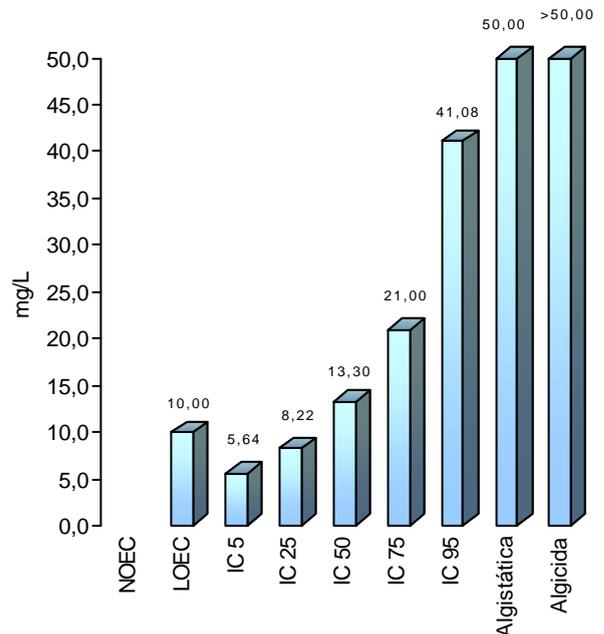
RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de *lindano* y *I. galbana*.

Resumen de resultados de toxicidad
Perido de exposición=72 h



Resumen de resultados de toxicidad
Perido de exposición=96 h



2.3. Dunaliella salina

Tabla A V.10.

Evolución de la biomasa de Dunaliella salina. Ensayo de LINDANO.

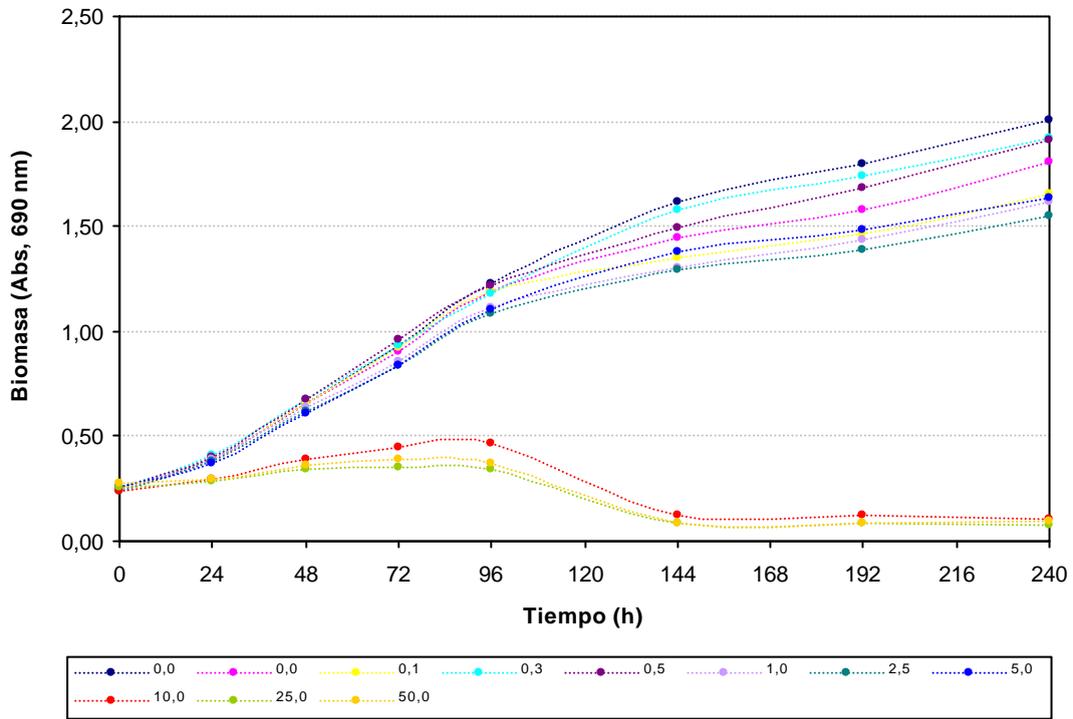
| D. salina. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | Abs´ = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| 0,00 | 0,248 | 0,400 | 0,681 | 0,982 | 1,273 | | | | 0,000 | 0,152 | 0,433 | 0,734 | 1,025 | | | | |
| | 0,273 | 0,399 | 0,683 | 0,960 | 1,264 | 1,614 | 1,792 | 2,001 | 0,000 | 0,126 | 0,410 | 0,687 | 0,991 | 1,341 | 1,519 | 1,728 | |
| | 0,248 | 0,371 | 0,613 | 0,853 | 1,146 | | | | 0,000 | 0,123 | 0,365 | 0,605 | 0,898 | | | | |
| 0,01 | 0,240 | 0,405 | 0,681 | 0,870 | 1,151 | | | | 0,000 | 0,165 | 0,441 | 0,630 | 0,911 | | | | |
| | 0,251 | 0,390 | 0,660 | 0,923 | 1,205 | 1,444 | 1,578 | 1,804 | 0,000 | 0,139 | 0,409 | 0,672 | 0,954 | 1,193 | 1,327 | 1,553 | |
| | 0,264 | 0,381 | 0,635 | 0,913 | 1,196 | | | | 0,000 | 0,117 | 0,371 | 0,649 | 0,932 | | | | |
| 0,10 | 0,256 | 0,428 | 0,700 | 0,985 | 1,282 | | | | 0,000 | 0,172 | 0,444 | 0,729 | 1,026 | | | | |
| | 0,238 | 0,380 | 0,635 | 0,868 | 1,123 | 1,347 | 1,468 | 1,658 | 0,000 | 0,142 | 0,397 | 0,630 | 0,885 | 1,109 | 1,230 | 1,420 | |
| | 0,255 | 0,373 | 0,629 | 0,910 | 1,164 | | | | 0,000 | 0,118 | 0,374 | 0,655 | 0,909 | | | | |
| 0,25 | 0,235 | 0,405 | 0,653 | 0,857 | 1,074 | | | | 0,000 | 0,170 | 0,418 | 0,622 | 0,839 | | | | |
| | 0,268 | 0,411 | 0,695 | 0,988 | 1,269 | 1,581 | 1,742 | 1,922 | 0,000 | 0,143 | 0,427 | 0,720 | 1,001 | 1,313 | 1,474 | 1,654 | |
| | 0,272 | 0,396 | 0,667 | 0,938 | 1,197 | | | | 0,000 | 0,124 | 0,395 | 0,666 | 0,925 | | | | |
| 0,50 | 0,246 | 0,414 | 0,674 | 0,959 | 1,189 | | | | 0,000 | 0,168 | 0,428 | 0,713 | 0,943 | | | | |
| | 0,258 | 0,407 | 0,708 | 0,989 | 1,248 | 1,492 | 1,687 | 1,907 | 0,000 | 0,149 | 0,450 | 0,731 | 0,990 | 1,234 | 1,429 | 1,649 | |
| | 0,256 | 0,383 | 0,649 | 0,929 | 1,204 | | | | 0,000 | 0,127 | 0,393 | 0,673 | 0,948 | | | | |
| 1,00 | 0,251 | 0,412 | 0,682 | 0,912 | 1,197 | | | | 0,000 | 0,161 | 0,431 | 0,661 | 0,946 | | | | |
| | 0,238 | 0,382 | 0,634 | 0,841 | 1,096 | 1,300 | 1,440 | 1,613 | 0,000 | 0,144 | 0,396 | 0,603 | 0,858 | 1,062 | 1,202 | 1,375 | |
| | 0,240 | 0,367 | 0,604 | 0,823 | 1,053 | | | | 0,000 | 0,127 | 0,364 | 0,583 | 0,813 | | | | |
| 2,50 | 0,235 | 0,397 | 0,639 | 0,848 | 1,098 | | | | 0,000 | 0,162 | 0,404 | 0,613 | 0,863 | | | | |
| | 0,235 | 0,374 | 0,609 | 0,831 | 1,063 | 1,289 | 1,390 | 1,554 | 0,000 | 0,139 | 0,374 | 0,596 | 0,828 | 1,054 | 1,155 | 1,319 | |
| | 0,244 | 0,360 | 0,604 | 0,840 | 1,081 | | | | 0,000 | 0,116 | 0,360 | 0,596 | 0,837 | | | | |
| 5,00 | 0,246 | 0,385 | 0,607 | 0,814 | 1,087 | | | | 0,000 | 0,139 | 0,361 | 0,568 | 0,841 | | | | |
| | 0,261 | 0,376 | 0,630 | 0,863 | 1,138 | 1,380 | 1,487 | 1,633 | 0,000 | 0,115 | 0,369 | 0,602 | 0,877 | 1,119 | 1,226 | 1,372 | |
| | 0,249 | 0,346 | 0,600 | 0,827 | 1,094 | | | | 0,000 | 0,097 | 0,351 | 0,578 | 0,845 | | | | |
| 10,00 | 0,268 | 0,345 | 0,450 | 0,503 | 0,444 | | | | 0,000 | 0,077 | 0,182 | 0,235 | 0,176 | | | | |
| | 0,244 | 0,304 | 0,411 | 0,490 | 0,464 | 0,125 | 0,120 | 0,103 | 0,000 | 0,060 | 0,167 | 0,246 | 0,220 | -0,119 | -0,124 | -0,141 | |
| | 0,196 | 0,230 | 0,303 | 0,359 | 0,486 | | | | 0,000 | 0,034 | 0,107 | 0,163 | 0,290 | | | | |
| 25,00 | 0,242 | 0,283 | 0,332 | 0,302 | 0,291 | | | | 0,000 | 0,041 | 0,090 | 0,060 | 0,049 | | | | |
| | 0,247 | 0,280 | 0,343 | 0,354 | 0,338 | 0,086 | 0,082 | 0,079 | 0,000 | 0,033 | 0,096 | 0,107 | 0,091 | -0,161 | -0,165 | -0,168 | |
| | 0,274 | 0,299 | 0,355 | 0,391 | 0,394 | | | | 0,000 | 0,025 | 0,081 | 0,117 | 0,120 | | | | |
| 50,00 | 0,273 | 0,305 | 0,379 | 0,396 | 0,325 | | | | 0,000 | 0,032 | 0,106 | 0,123 | 0,052 | | | | |
| | 0,276 | 0,277 | 0,348 | 0,366 | 0,394 | 0,087 | 0,087 | 0,097 | 0,000 | 0,001 | 0,072 | 0,090 | 0,118 | -0,189 | -0,189 | -0,179 | |
| | 0,287 | 0,304 | 0,370 | 0,402 | 0,406 | | | | 0,000 | 0,017 | 0,083 | 0,115 | 0,119 | | | | |

Tabla A V.11.

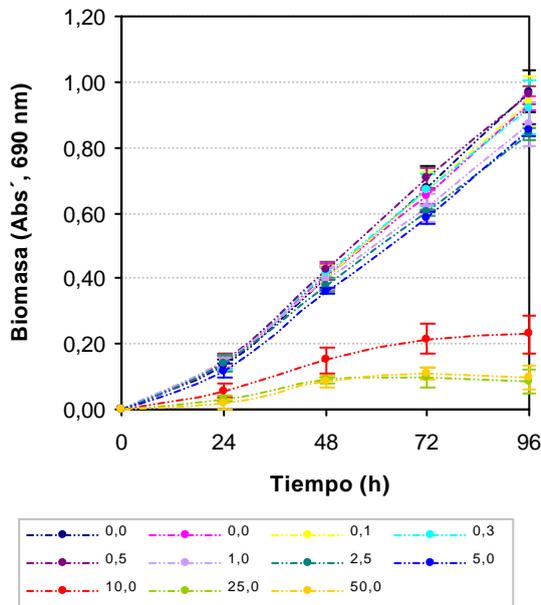
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs´)

| t (h) | mg/L LINDANO | | | | | | | | | | | Promedio |
|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| | 0,000 | 0,001 | 0,010 | 0,025 | 0,050 | 1,00 | 2,50 | 5,0 | 10 | 25 | 50 | |
| 24 | 0,134 | 0,140 | 0,144 | 0,146 | 0,148 | 0,144 | 0,139 | 0,117 | 0,057 | 0,033 | 0,017 | Promedio |
| | 0,016 | 0,024 | 0,027 | 0,023 | 0,021 | 0,017 | 0,023 | 0,021 | 0,022 | 0,008 | 0,016 | DesvEst |
| 48 | 0,403 | 0,407 | 0,405 | 0,413 | 0,424 | 0,397 | 0,379 | 0,360 | 0,152 | 0,089 | 0,087 | Promedio |
| | 0,035 | 0,035 | 0,036 | 0,017 | 0,029 | 0,034 | 0,022 | 0,009 | 0,040 | 0,008 | 0,017 | DesvEst |
| 72 | 0,675 | 0,650 | 0,671 | 0,669 | 0,706 | 0,616 | 0,602 | 0,583 | 0,215 | 0,095 | 0,109 | Promedio |
| | 0,065 | 0,021 | 0,051 | 0,049 | 0,030 | 0,041 | 0,010 | 0,017 | 0,045 | 0,030 | 0,017 | DesvEst |
| 96 | 0,971 | 0,932 | 0,940 | 0,922 | 0,960 | 0,872 | 0,843 | 0,854 | 0,229 | 0,087 | 0,096 | Promedio |
| | 0,066 | 0,022 | 0,075 | 0,081 | 0,026 | 0,068 | 0,018 | 0,020 | 0,057 | 0,036 | 0,038 | DesvEst |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

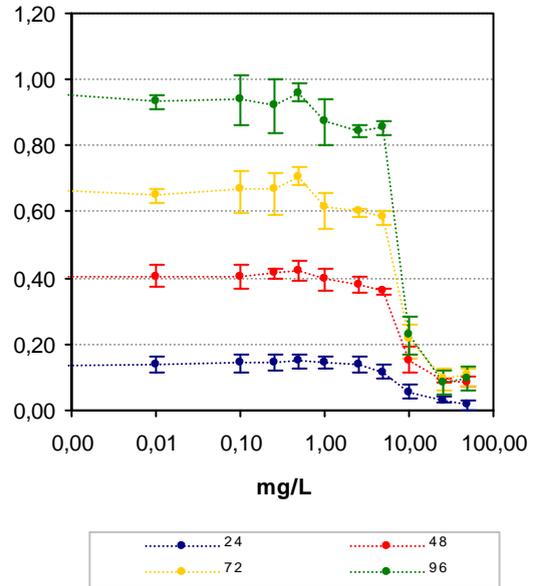


Tabla A V.12.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *D. salina* expuesta a diferentes concentraciones de LINDANO.

| <i>D. salina</i> | 24 horas (**) | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|--|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,921 | | 0,963 | | 0,982 | | 0,974 | |
| B calculado | 2,78 | | 7,85 | | 9,03 | | 9,28 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L LINDANO | t _i | p |
| 0,01 | -0,40 | 0,35466 | -0,19 | 0,44311 | 0,80 | 0,28106 | 0,93 | 0,19204 |
| 0,10 | -0,62 | 0,29962 | -0,10 | 0,46954 | 0,13 | 0,46880 | 0,75 | 0,30819 |
| 0,25 | -0,72 | 0,25016 | -0,47 | 0,32747 | 0,19 | 0,45245 | 1,18 | 0,22805 |
| 0,50 | -0,86 | 0,19676 | -0,93 | 0,23201 | -0,98 | 0,25222 | 0,26 | 0,40035 |
| 1,00 | -0,62 | 0,24270 | 0,25 | 0,42423 | 1,92 | 0,12491 | 2,36 | 0,07163 |
| 2,5 | -0,32 | 0,37896 | 1,03 | 0,19135 | 2,37 | 0,06272 | 3,07 (*) | 0,01544 |
| 5,0 | 1,00 | 0,16802 | 1,87 | 0,05476 | 2,98 (*) | 0,03821 | 2,79 | 0,02094 |
| 10,0 | 4,61 (*) | 0,00392 | 11,08 (*) | 0,00059 | 14,82 | 0,00027 | 17,70 | 0,00006 |
| 25,0 | 6,06 | 0,00031 | 13,87 | 0,00005 | 18,68 | 0,00008 | 21,08 | 0,00002 |
| 50,0 | 7,04 | 0,00040 | 13,96 | 0,00007 | 18,21 | 0,00007 | 20,85 | 0,00002 |
| MSD | 0,044 | | 0,060 | | 0,082 | | 0,111 | |
| % reducción | 32,81 | | 14,83 | | 12,15 | | 11,41 | |
| <p><i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64</p> <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola).</p> <p>** Análisis estadístico realizado a partir de los datos transformados logarítmicamente ($\log(x+1)$).</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|------|-------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| <i>t=72 h</i> | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,966 | | 0,974 | | 0,975 | | 0,980 | | 0,980 | | 0,982 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 2,42 | | 5,84 | | 7,34 | | 7,43 | | 7,64 | | 9,03 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L LINDANO | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,01 | 0,68 | 0,28 | 0,73 | 0,28 | 0,77 | 0,28 | 0,76 | 0,28 | 0,77 | 0,28 | 0,80 | 0,28 |
| 0,10 | 0,11 | 0,47 | 0,12 | 0,47 | 0,12 | 0,47 | 0,12 | 0,47 | 0,12 | 0,47 | 0,13 | 0,47 |
| 0,25 | 0,16 | 0,45 | 0,17 | 0,45 | 0,18 | 0,45 | 0,18 | 0,45 | 0,19 | 0,45 | 0,19 | 0,45 |
| 0,50 | -0,82 | 0,25 | -0,88 | 0,25 | -0,93 | 0,25 | -0,92 | 0,25 | -0,94 | 0,25 | -0,98 | 0,25 |
| 1,00 | 1,61 | 0,12 | 1,74 | 0,12 | 1,83 | 0,12 | 1,81 | 0,12 | 1,85 | 0,12 | 1,92 | 0,12 |
| 2,5 | --- | --- | 2,15 | 0,06 | 2,27 | 0,06 | 2,23 | 0,06 | 2,28 | 0,06 | 2,37 | 0,06 |
| 5,0 | --- | --- | --- | --- | 2,85(*) | 0,04 | 2,81(*) | 0,04 | 2,87(*) | 0,04 | 2,98(*) | 0,04 |
| 10,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 13,95 | 0,00 | 14,26 | 0,00 | 14,82 | 0,00 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 17,98 | 0,00 | 18,68 | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 18,21 | 0,00 |
| MSD | 0,092 | | 0,087 | | 0,083 | | 0,085 | | 0,084 | | 0,082 | |
| % reducción | 13,68 | | 12,87 | | 12,33 | | 12,62 | | 12,43 | | 12,15 | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | | | | | |

Tabla A V.13.
Valores de ICp del ensayo de *D. salina* y LINDANO a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de LINDANO estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf | Valor medio | Lim. Conf. Original. Inf | Lim. Conf. Expandido Inf | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,7786 | -0,8552 | 0,0006 | 0,6760 | 1,5874 | 2,4770 | 0,3759 |
| | 25 | 6,0349 | 4,7518 | 5,4239 | 5,9320 | 6,3125 | 6,6179 | 0,2348 |
| | 50 | 8,3288 | 7,1905 | 7,7868 | 8,2618 | 8,6830 | 9,0725 | 0,2390 |
| | 75 | 16,1021 | 3,1781 | 9,9478 | 15,5968 | 18,4440 | 21,0201 | 2,0800 |
| | 95 | (*) | | | | | | |
| 96 | 5 | 0,6194 | -0,6800 | 0,0006 | 0,4962 | 1,5096 | 2,4889 | 0,4290 |
| | 25 | 5,9680 | 5,2499 | 5,6260 | 5,9373 | 6,2727 | 6,6078 | 0,1761 |
| | 50 | 7,9269 | 7,2340 | 7,5969 | 7,9112 | 8,2483 | 8,6018 | 0,1693 |
| | 75 | 9,8857 | 9,0733 | 9,4989 | 10,3406 | 13,1783 | 16,8001 | 1,0255 |
| | 95 | (*) | | | | | | |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

(*) No es posible realizar la interpolación lineal del conjunto de datos para este porcentaje de respuesta

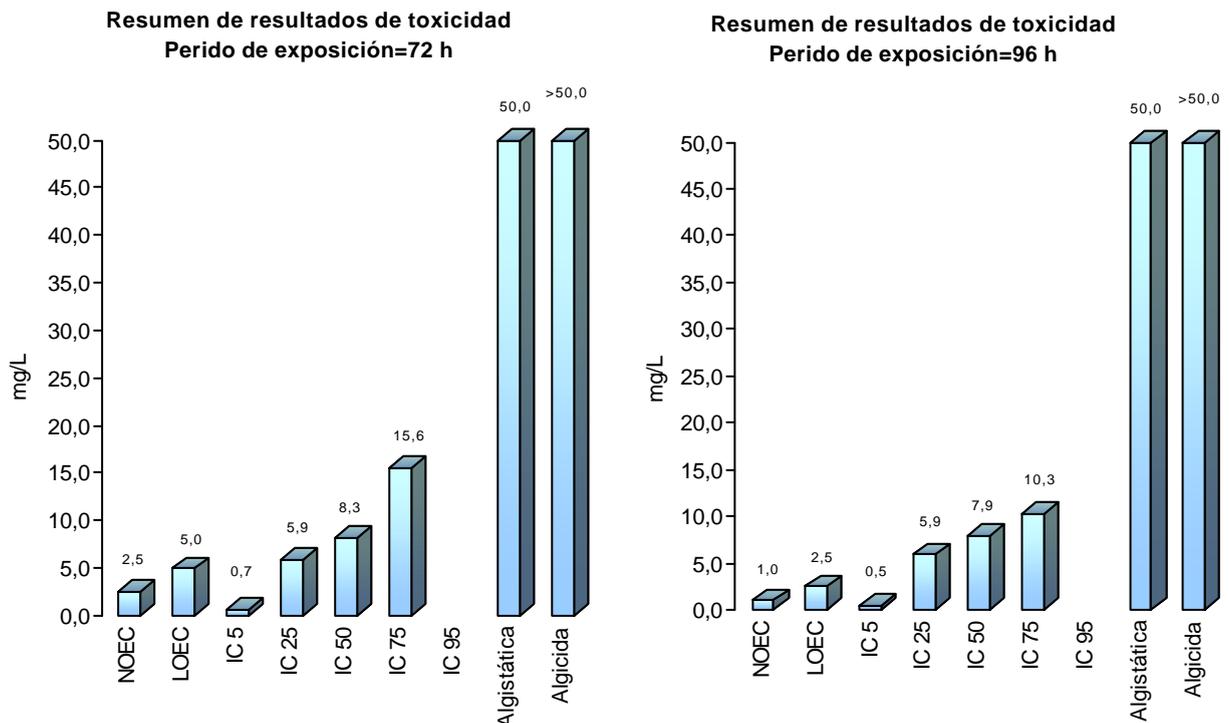
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de *lindano* ensayadas con *D. salina* (50, 25, 10 y 5 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa en todos los viales.

- Concentración alguistática= 50 mg/L
- Concentración alguicida= No determinado experimentalmente

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de *lindano* y *D. salina*.



2.4. *Chaetoceros gracilis*

Tabla A V.14.

Evolución de la biomasa de *Chaetoceros gracilis*. Ensayo de LINDANO.

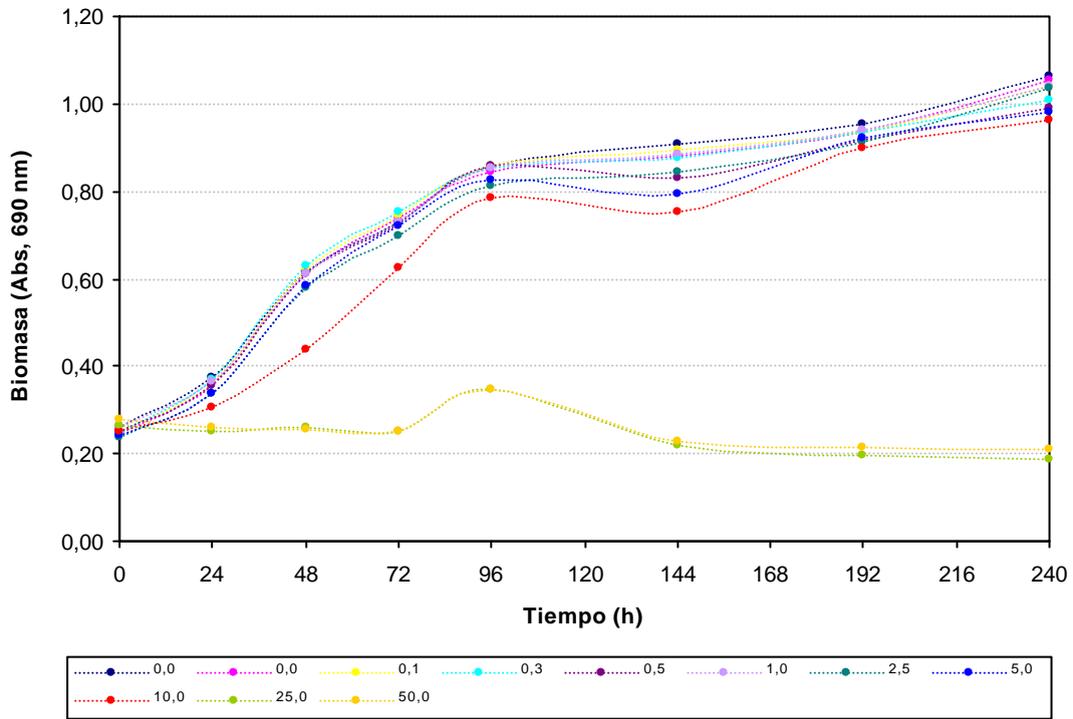
| C. gracilis Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| 0,00 | 0,248 | 0,389 | 0,635 | 0,715 | 0,864 | | | | 0,000 | 0,141 | 0,387 | 0,467 | 0,616 | | | | |
| | 0,266 | 0,377 | 0,617 | 0,754 | 0,851 | 0,907 | 0,955 | 1,063 | 0,000 | 0,111 | 0,351 | 0,488 | 0,585 | 0,641 | 0,689 | 0,797 | |
| | 0,266 | 0,351 | 0,601 | 0,719 | 0,863 | | | | 0,000 | 0,085 | 0,335 | 0,453 | 0,597 | | | | |
| 0,01 | 0,235 | 0,364 | 0,621 | 0,703 | 0,843 | | | | 0,000 | 0,129 | 0,386 | 0,468 | 0,608 | | | | |
| | 0,255 | 0,356 | 0,609 | 0,720 | 0,836 | 0,882 | 0,937 | 1,053 | 0,000 | 0,101 | 0,354 | 0,465 | 0,581 | 0,627 | 0,682 | 0,798 | |
| | 0,256 | 0,346 | 0,604 | 0,792 | 0,851 | | | | 0,000 | 0,090 | 0,348 | 0,536 | 0,595 | | | | |
| 0,10 | 0,254 | 0,385 | 0,655 | 0,757 | 0,877 | | | | 0,000 | 0,131 | 0,401 | 0,503 | 0,623 | | | | |
| | 0,244 | 0,357 | 0,621 | 0,721 | 0,840 | 0,896 | 0,935 | 1,040 | 0,000 | 0,113 | 0,377 | 0,477 | 0,596 | 0,652 | 0,691 | 0,796 | |
| | 0,258 | 0,340 | 0,591 | 0,750 | 0,853 | | | | 0,000 | 0,082 | 0,333 | 0,492 | 0,595 | | | | |
| 0,25 | 0,253 | 0,390 | 0,653 | 0,770 | 0,857 | | | | 0,000 | 0,137 | 0,400 | 0,517 | 0,604 | | | | |
| | 0,231 | 0,357 | 0,620 | 0,734 | 0,843 | 0,874 | 0,937 | 1,007 | 0,000 | 0,126 | 0,389 | 0,503 | 0,612 | 0,643 | 0,706 | 0,776 | |
| | 0,261 | 0,364 | 0,615 | 0,752 | 0,856 | | | | 0,000 | 0,103 | 0,354 | 0,491 | 0,595 | | | | |
| 0,50 | 0,250 | 0,364 | 0,634 | 0,757 | 0,871 | | | | 0,000 | 0,114 | 0,384 | 0,507 | 0,621 | | | | |
| | 0,238 | 0,352 | 0,608 | 0,713 | 0,849 | 0,831 | 0,918 | 0,990 | 0,000 | 0,114 | 0,370 | 0,475 | 0,611 | 0,593 | 0,680 | 0,752 | |
| | 0,263 | 0,352 | 0,586 | 0,705 | 0,855 | | | | 0,000 | 0,089 | 0,323 | 0,442 | 0,592 | | | | |
| 1,00 | 0,263 | 0,390 | 0,640 | 0,763 | 0,882 | | | | 0,000 | 0,127 | 0,377 | 0,500 | 0,619 | | | | |
| | 0,255 | 0,359 | 0,615 | 0,690 | 0,849 | 0,883 | 0,942 | 1,041 | 0,000 | 0,104 | 0,360 | 0,435 | 0,594 | 0,628 | 0,687 | 0,786 | |
| | 0,256 | 0,348 | 0,577 | 0,734 | 0,834 | | | | 0,000 | 0,092 | 0,321 | 0,478 | 0,578 | | | | |
| 2,50 | 0,228 | 0,355 | 0,608 | 0,716 | 0,819 | | | | 0,000 | 0,127 | 0,380 | 0,488 | 0,591 | | | | |
| | 0,253 | 0,344 | 0,578 | 0,675 | 0,800 | 0,845 | 0,912 | 1,034 | 0,000 | 0,091 | 0,325 | 0,422 | 0,547 | 0,592 | 0,659 | 0,781 | |
| | 0,231 | 0,316 | 0,550 | 0,700 | 0,811 | | | | 0,000 | 0,085 | 0,319 | 0,469 | 0,580 | | | | |
| 5,00 | 0,242 | 0,349 | 0,603 | 0,747 | 0,827 | | | | 0,000 | 0,107 | 0,361 | 0,505 | 0,585 | | | | |
| | 0,232 | 0,320 | 0,573 | 0,696 | 0,809 | 0,795 | 0,920 | 0,980 | 0,000 | 0,088 | 0,341 | 0,464 | 0,577 | 0,563 | 0,688 | 0,748 | |
| | 0,258 | 0,346 | 0,574 | 0,720 | 0,839 | | | | 0,000 | 0,088 | 0,316 | 0,462 | 0,581 | | | | |
| 10,00 | 0,242 | 0,310 | 0,461 | 0,667 | 0,809 | | | | 0,000 | 0,068 | 0,219 | 0,425 | 0,567 | | | | |
| | 0,254 | 0,304 | 0,429 | 0,634 | 0,792 | 0,754 | 0,901 | 0,965 | 0,000 | 0,050 | 0,175 | 0,380 | 0,538 | 0,500 | 0,647 | 0,711 | |
| | 0,261 | 0,305 | 0,418 | 0,573 | 0,750 | | | | 0,000 | 0,044 | 0,157 | 0,312 | 0,489 | | | | |
| 25,00 | 0,270 | 0,254 | 0,259 | 0,246 | 0,341 | | | | 0,000 | -0,016 | -0,011 | -0,024 | 0,071 | | | | |
| | 0,274 | 0,266 | 0,267 | 0,262 | 0,360 | 0,218 | 0,198 | 0,186 | 0,000 | -0,008 | -0,007 | -0,012 | 0,086 | -0,056 | -0,076 | -0,088 | |
| | 0,253 | 0,239 | 0,254 | 0,241 | 0,337 | | | | 0,000 | -0,014 | 0,001 | -0,012 | 0,084 | | | | |
| 50,00 | 0,279 | 0,264 | 0,260 | 0,259 | 0,353 | | | | 0,000 | -0,015 | -0,019 | -0,020 | 0,074 | | | | |
| | 0,291 | 0,271 | 0,265 | 0,261 | 0,359 | 0,229 | 0,215 | 0,209 | 0,000 | -0,020 | -0,026 | -0,030 | 0,068 | -0,062 | -0,076 | -0,082 | |
| | 0,261 | 0,242 | 0,239 | 0,236 | 0,322 | | | | 0,000 | -0,019 | -0,022 | -0,025 | 0,061 | | | | |

Tabla A V.15.

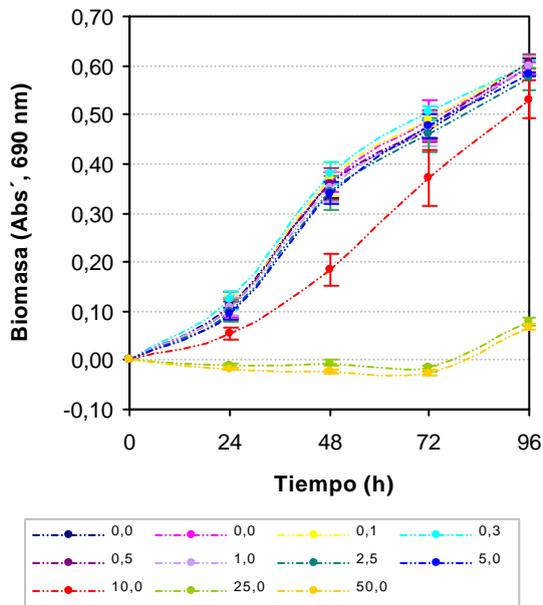
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs')

| t (h) | mg/L LINDANO | | | | | | | | | | | Promedio |
|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|----------|
| | 0,000 | 0,001 | 0,010 | 0,025 | 0,050 | 1,00 | 2,50 | 5,0 | 10 | 25 | 50 | |
| 24 | 0,112 | 0,107 | 0,109 | 0,122 | 0,106 | 0,108 | 0,101 | 0,094 | 0,054 | -0,013 | -0,018 | DesvEst |
| | 0,028 | 0,020 | 0,025 | 0,017 | 0,014 | 0,018 | 0,023 | 0,011 | 0,012 | 0,004 | 0,003 | |
| 48 | 0,358 | 0,363 | 0,370 | 0,381 | 0,359 | 0,353 | 0,341 | 0,339 | 0,184 | -0,006 | -0,022 | DesvEst |
| | 0,027 | 0,020 | 0,034 | 0,024 | 0,032 | 0,029 | 0,034 | 0,023 | 0,032 | 0,006 | 0,004 | |
| 72 | 0,469 | 0,490 | 0,491 | 0,504 | 0,475 | 0,471 | 0,460 | 0,477 | 0,372 | -0,016 | -0,025 | DesvEst |
| | 0,018 | 0,040 | 0,013 | 0,013 | 0,033 | 0,033 | 0,034 | 0,024 | 0,057 | 0,007 | 0,005 | |
| 96 | 0,599 | 0,595 | 0,605 | 0,604 | 0,608 | 0,597 | 0,573 | 0,581 | 0,531 | 0,080 | 0,068 | DesvEst |
| | 0,016 | 0,014 | 0,016 | 0,009 | 0,015 | 0,021 | 0,023 | 0,004 | 0,039 | 0,008 | 0,007 | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

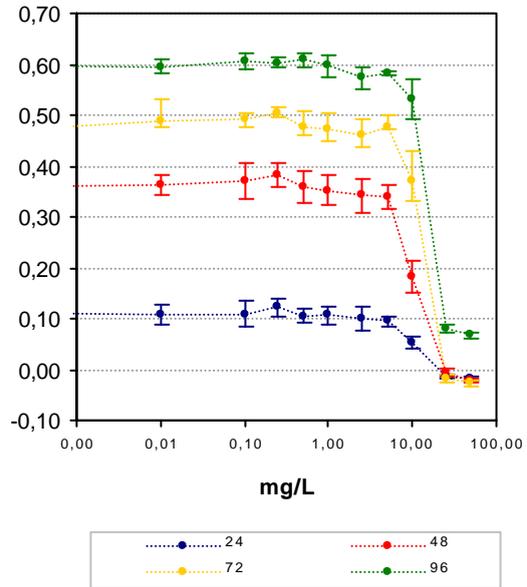


Tabla A V.16.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *C. gracilis* expuesta a diferentes concentraciones de LINDANO.

| <i>C. gracilis</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|--|----------|---------|----------|---------|----------|---------|----------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,971 | | 0,962 | | 0,986 | | 0,984 | |
| B calculado | 10,90 | | 9,63 | | 14,18 | | 12,55 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L LINDANO | t_i | p | t_i | p | t_i | p | t_i | p |
| 0,01 | 0,39 | 0,39505 | -0,24 | 0,40457 | -0,85 | 0,23344 | 0,32 | 0,35776 |
| 0,10 | 0,25 | 0,43672 | -0,60 | 0,32054 | -0,89 | 0,08360 | -0,36 | 0,34989 |
| 0,25 | -0,67 | 0,31910 | -1,10 | 0,16142 | -1,43 | 0,02662 | -0,29 | 0,34743 |
| 0,50 | 0,46 | 0,36634 | -0,06 | 0,47919 | -0,22 | 0,40750 | -0,59 | 0,26156 |
| 1,00 | 0,32 | 0,40979 | 0,24 | 0,41791 | -0,07 | 0,47114 | 0,16 | 0,44180 |
| 2,5 | 0,78 | 0,30762 | 0,77 | 0,27278 | 0,40 | 0,34217 | 1,81 | 0,08553 |
| 5,0 | 1,25 | 0,17937 | 0,86 | 0,20715 | -0,32 | 0,34040 | 1,24 | 0,06022 |
| 10,0 | 4,04 (*) | 0,01506 | 8,19 (*) | 0,00096 | 4,05 (*) | 0,02389 | 4,60 (*) | 0,02498 |
| 25,0 | 8,65 | 0,00079 | 17,11 | 0,00001 | 20,26 | 0,00000 | 35,14 | 0,00000 |
| 50,0 | 9,02 | 0,00066 | 17,89 | 0,00001 | 20,64 | 0,00000 | 36,00 | 0,00000 |
| MSD | 0,038 | | 0,056 | | 0,063 | | 0,039 | |
| % reducción | 33,97 | | 15,68 | | 13,47 | | 6,51 | |
| <p><i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola).</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|------|-------|------|-------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| $t=72 h$ | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,978 | | 0,975 | | 0,971 | | 0,988 | | 0,989 | | 0,986 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 3,78 | | 3,94 | | 4,01 | | 6,24 | | 9,76 | | 14,18 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L LINDANO | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,01 | -0,92 | 0,23 | -0,88 | 0,23 | -0,90 | 0,23 | -0,77 | 0,23 | -0,81 | 0,23 | -0,85 | 0,23 |
| 0,10 | -0,96 | 0,08 | -0,93 | 0,08 | -0,94 | 0,08 | -0,81 | 0,08 | -0,85 | 0,08 | -0,89 | 0,08 |
| 0,25 | -1,55 | 0,03 | -1,49 | 0,03 | -1,52 | 0,03 | -1,30 | 0,03 | -1,37 | 0,03 | -1,43 | 0,03 |
| 0,50 | -0,24 | 0,41 | -0,23 | 0,41 | -0,24 | 0,41 | -0,20 | 0,41 | -0,21 | 0,41 | -0,22 | 0,41 |
| 1,00 | -0,08 | 0,47 | -0,07 | 0,47 | -0,07 | 0,47 | -0,06 | 0,47 | -0,07 | 0,47 | -0,07 | 0,47 |
| 2,5 | --- | --- | 0,42 | 0,34 | 0,43 | 0,34 | 0,37 | 0,34 | 0,39 | 0,34 | 0,40 | 0,34 |
| 5,0 | --- | --- | --- | --- | -0,34 | 0,34 | -0,29 | 0,34 | -0,31 | 0,34 | -0,32 | 0,34 |
| 10,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 3,68(*) | 0,02 | 3,87(*) | 0,02 | 4,05(*) | 0,02 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 19,35 | 0,00 | 20,26 | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 20,64 | 0,00 |
| MSD | 0,055 | | 0,058 | | 0,058 | | 0,068 | | 0,065 | | 0,063 | |
| % reducción | 11,79 | | 12,41 | | 12,35 | | 14,50 | | 13,90 | | 13,47 | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | | | | | |

Tabla A V.17.
Valores de ICp del ensayo de *C. gracilis* y LINDANO a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de LINDANO estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf | Valor medio | Lim. Conf. Original. Inf | Lim. Conf. Expandido Inf | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 5,2300 | -4,8116 | 0,4483 | 3,5394 | 6,0755 | 7,0056 | 2,1131 |
| | 25 | 10,2451 | 5,9472 | 8,1985 | 10,2056 | 12,0329 | 13,9996 | 1,0238 |
| | 50 | 15,1634 | 11,3337 | 13,3397 | 15,1022 | 16,3015 | 17,5534 | 0,7631 |
| | 75 | 20,0817 | 18,0802 | 19,1286 | 20,0377 | 20,6853 | 21,3493 | 0,3804 |
| | 95 | 24,0163 | 23,6320 | 23,8333 | 24,0148 | 24,1343 | 24,2641 | 0,0733 |
| 96 | 5 | 5,5352 | -2,5674 | 1,6768 | 4,7267 | 7,1343 | 8,8933 | 1,6866 |
| | 25 | 12,6535 | 9,8945 | 11,3397 | 12,5884 | 13,5005 | 14,4322 | 0,5502 |
| | 50 | 17,6596 | 16,0847 | 16,9097 | 17,6204 | 18,1832 | 18,7592 | 0,3324 |
| | 75 | 22,6657 | 21,9610 | 22,3302 | 22,6492 | 22,9260 | 23,2123 | 0,1533 |
| | 95 | (*) | | | | | | |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

(*) No es posible realizar la interpolación lineal del conjunto de datos para este porcentaje de respuesta

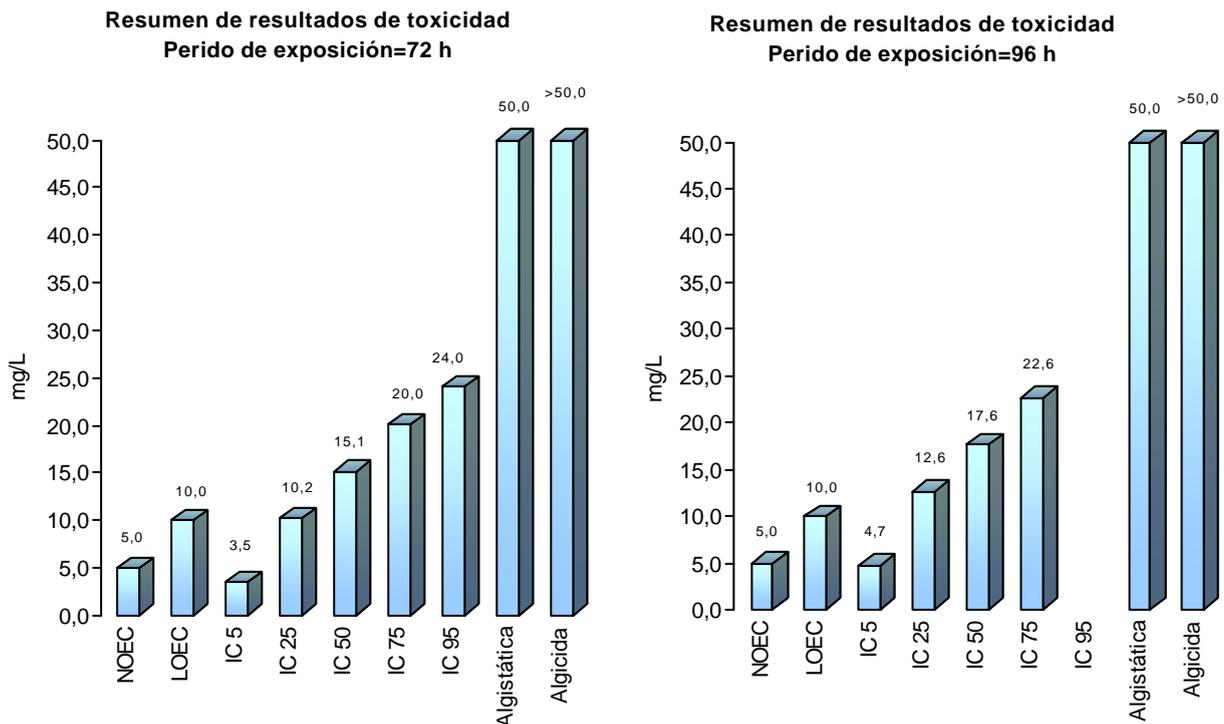
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de *lindano* ensayadas con *C. gracilis* (50, 25, 10 y 5 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa en todos los viales.

- Concentración alguistática= 50 mg/L
- Concentración alguicida= No determinado experimentalmente

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de *lindano* y *C. gracilis*.



2.5. *Tetraselmis chuii*

Tabla A V.18.

Evolución de la biomasa de *Tetraselmis chuii*. Ensayo de LINDANO.

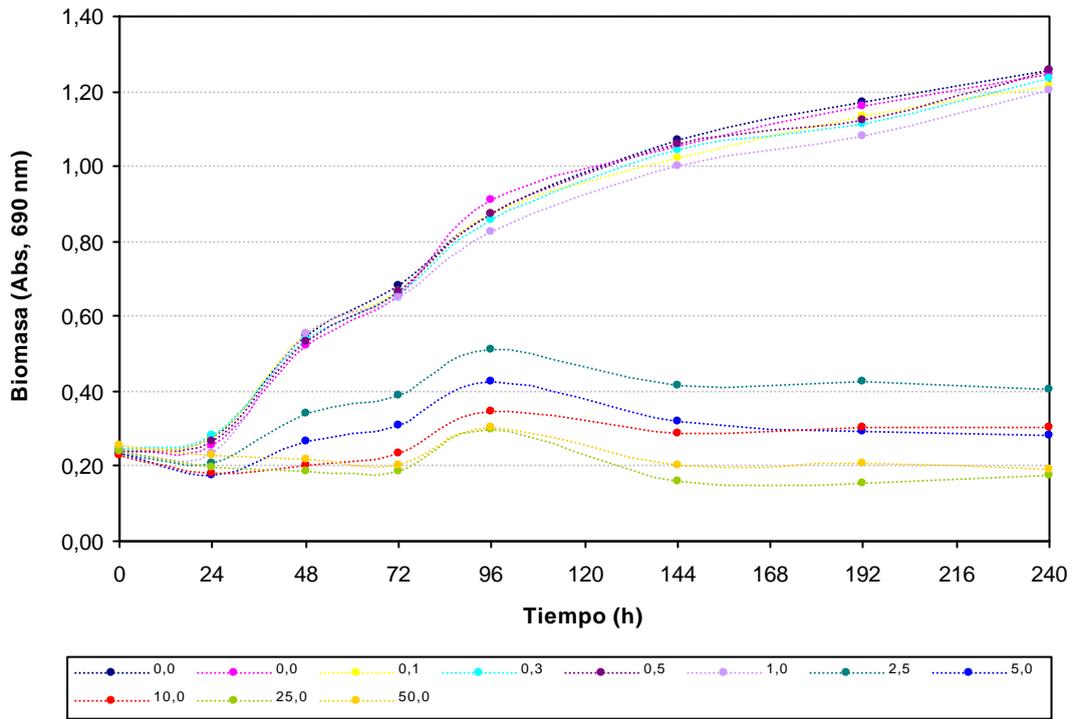
| | | <i>T. chuii</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | |
|------|-------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|
| t(d) | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| t(h) | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| | 0,00 | 0,244 | 0,269 | 0,561 | 0,672 | 0,851 | | | | 0,000 | 0,025 | 0,317 | 0,428 | 0,607 | | | |
| | | 0,262 | 0,302 | 0,552 | 0,718 | 0,903 | 1,072 | 1,170 | 1,257 | 0,000 | 0,040 | 0,290 | 0,456 | 0,641 | 0,810 | 0,908 | 0,995 |
| | | 0,230 | 0,255 | 0,525 | 0,661 | 0,871 | | | | 0,000 | 0,025 | 0,295 | 0,431 | 0,641 | | | |
| | 0,01 | 0,239 | 0,259 | 0,536 | 0,662 | 0,956 | | | | 0,000 | 0,020 | 0,297 | 0,423 | 0,717 | | | |
| | | 0,256 | 0,280 | 0,530 | 0,637 | 0,866 | 1,054 | 1,163 | 1,243 | 0,000 | 0,024 | 0,274 | 0,381 | 0,610 | 0,798 | 0,907 | 0,987 |
| | | 0,230 | 0,233 | 0,498 | 0,662 | 0,908 | | | | 0,000 | 0,003 | 0,268 | 0,432 | 0,678 | | | |
| | 0,10 | 0,256 | 0,305 | 0,585 | 0,691 | 0,873 | | | | 0,000 | 0,049 | 0,329 | 0,435 | 0,617 | | | |
| | | 0,243 | 0,268 | 0,552 | 0,681 | 0,903 | 1,020 | 1,132 | 1,212 | 0,000 | 0,025 | 0,309 | 0,438 | 0,660 | 0,777 | 0,889 | 0,969 |
| | | 0,241 | 0,264 | 0,526 | 0,632 | 0,837 | | | | 0,000 | 0,023 | 0,285 | 0,391 | 0,596 | | | |
| | 0,25 | 0,263 | 0,311 | 0,581 | 0,646 | 0,853 | | | | 0,000 | 0,048 | 0,318 | 0,383 | 0,590 | | | |
| | | 0,227 | 0,273 | 0,515 | 0,689 | 0,918 | 1,046 | 1,111 | 1,235 | 0,000 | 0,046 | 0,288 | 0,462 | 0,691 | 0,819 | 0,884 | 1,008 |
| | | 0,244 | 0,270 | 0,519 | 0,653 | 0,808 | | | | 0,000 | 0,026 | 0,275 | 0,409 | 0,564 | | | |
| | 0,50 | 0,226 | 0,262 | 0,555 | 0,692 | 0,872 | | | | 0,000 | 0,036 | 0,329 | 0,466 | 0,646 | | | |
| | | 0,235 | 0,278 | 0,522 | 0,687 | 0,888 | 1,059 | 1,123 | 1,256 | 0,000 | 0,043 | 0,287 | 0,452 | 0,653 | 0,824 | 0,888 | 1,021 |
| | | 0,262 | 0,264 | 0,512 | 0,619 | 0,852 | | | | 0,000 | 0,002 | 0,250 | 0,357 | 0,590 | | | |
| | 1,00 | 0,253 | 0,264 | 0,613 | 0,691 | 0,860 | | | | 0,000 | 0,011 | 0,360 | 0,438 | 0,607 | | | |
| | | 0,227 | 0,203 | 0,553 | 0,642 | 0,803 | 1,001 | 1,083 | 1,203 | 0,000 | -0,024 | 0,326 | 0,415 | 0,576 | 0,774 | 0,856 | 0,976 |
| | | 0,231 | 0,228 | 0,494 | 0,619 | 0,817 | | | | 0,000 | -0,003 | 0,263 | 0,388 | 0,586 | | | |
| | 2,50 | 0,226 | 0,212 | 0,325 | 0,377 | 0,501 | | | | 0,000 | -0,014 | 0,099 | 0,151 | 0,275 | | | |
| | | 0,244 | 0,219 | 0,370 | 0,406 | 0,539 | 0,413 | 0,426 | 0,402 | 0,000 | -0,025 | 0,126 | 0,162 | 0,295 | 0,169 | 0,182 | 0,158 |
| | | 0,230 | 0,184 | 0,322 | 0,386 | 0,491 | | | | 0,000 | -0,046 | 0,092 | 0,156 | 0,261 | | | |
| | 5,00 | 0,246 | 0,192 | 0,278 | 0,326 | 0,428 | | | | 0,000 | -0,054 | 0,032 | 0,080 | 0,182 | | | |
| | | 0,220 | 0,160 | 0,244 | 0,286 | 0,424 | 0,319 | 0,291 | 0,282 | 0,000 | -0,060 | 0,024 | 0,066 | 0,204 | 0,099 | 0,071 | 0,062 |
| | | 0,235 | 0,170 | 0,270 | 0,317 | 0,430 | | | | 0,000 | -0,065 | 0,035 | 0,082 | 0,195 | | | |
| | 10,00 | 0,228 | 0,168 | 0,196 | 0,232 | 0,345 | | | | 0,000 | -0,060 | -0,032 | 0,004 | 0,117 | | | |
| | | 0,238 | 0,201 | 0,236 | 0,259 | 0,370 | 0,287 | 0,302 | 0,305 | 0,000 | -0,037 | -0,002 | 0,021 | 0,132 | 0,049 | 0,064 | 0,067 |
| | | 0,219 | 0,181 | 0,172 | 0,204 | 0,321 | | | | 0,000 | -0,038 | -0,047 | -0,015 | 0,102 | | | |
| | 25,00 | 0,248 | 0,204 | 0,190 | 0,184 | 0,300 | | | | 0,000 | -0,044 | -0,058 | -0,064 | 0,052 | | | |
| | | 0,228 | 0,189 | 0,185 | 0,187 | 0,297 | 0,162 | 0,153 | 0,175 | 0,000 | -0,039 | -0,043 | -0,041 | 0,069 | -0,066 | -0,075 | -0,053 |
| | | 0,241 | 0,199 | 0,183 | 0,185 | 0,302 | | | | 0,000 | -0,042 | -0,058 | -0,056 | 0,061 | | | |
| | 50,00 | 0,251 | 0,227 | 0,207 | 0,194 | 0,297 | | | | 0,000 | -0,024 | -0,044 | -0,057 | 0,046 | | | |
| | | 0,270 | 0,251 | 0,244 | 0,233 | 0,336 | 0,200 | 0,209 | 0,191 | 0,000 | -0,019 | -0,026 | -0,037 | 0,066 | -0,070 | -0,061 | -0,079 |
| | | 0,241 | 0,215 | 0,198 | 0,180 | 0,277 | | | | 0,000 | -0,026 | -0,043 | -0,061 | 0,036 | | | |

Tabla A V.19.

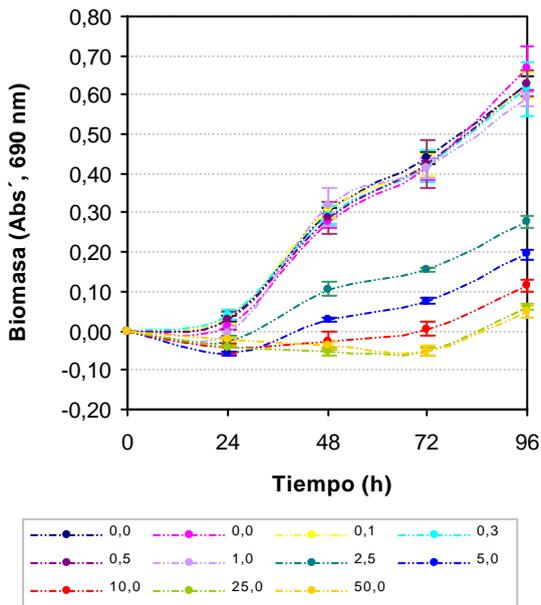
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs')

| t (h) | mg/L LINDANO | | | | | | | | | | | Promedio |
|-------|--------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| | 0,000 | 0,001 | 0,010 | 0,025 | 0,050 | 1,00 | 2,50 | 5,0 | 10 | 25 | 50 | |
| 24 | 0,030 | 0,016 | 0,032 | 0,040 | 0,027 | -0,005 | -0,028 | -0,060 | -0,045 | -0,042 | -0,023 | Promedio |
| | 0,009 | 0,011 | 0,014 | 0,012 | 0,022 | 0,018 | 0,016 | 0,006 | 0,013 | 0,003 | 0,004 | DesvEst |
| 48 | 0,301 | 0,280 | 0,308 | 0,294 | 0,289 | 0,316 | 0,106 | 0,030 | -0,027 | -0,053 | -0,038 | Promedio |
| | 0,014 | 0,015 | 0,022 | 0,022 | 0,040 | 0,049 | 0,018 | 0,006 | 0,023 | 0,009 | 0,010 | DesvEst |
| 72 | 0,438 | 0,412 | 0,421 | 0,418 | 0,425 | 0,414 | 0,156 | 0,076 | 0,003 | -0,054 | -0,052 | Promedio |
| | 0,015 | 0,027 | 0,026 | 0,040 | 0,059 | 0,025 | 0,006 | 0,009 | 0,018 | 0,012 | 0,013 | DesvEst |
| 96 | 0,630 | 0,668 | 0,624 | 0,615 | 0,630 | 0,590 | 0,277 | 0,194 | 0,117 | 0,061 | 0,049 | Promedio |
| | 0,020 | 0,054 | 0,033 | 0,067 | 0,035 | 0,016 | 0,017 | 0,011 | 0,015 | 0,009 | 0,015 | DesvEst |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

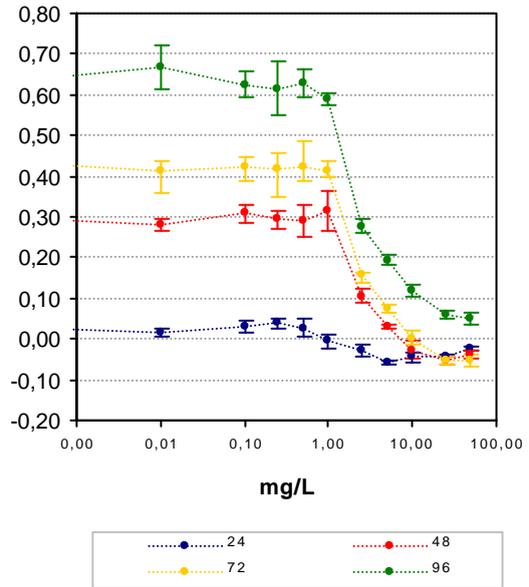


Tabla A V.20.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *T. chuii* expuesta a diferentes concentraciones de LINDANO.

| <i>T. chuii</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|--|----------|---------|----------|---------|-----------|---------|-----------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,962 | | 0,962 | | 0,966 | | 0,969 | |
| B calculado | 10,72 | | 12,45 | | 14,47 | | 14,71 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L LINDANO | t_i | p | t_i | p | t_i | p | t_i | p |
| 0,01 | 1,36 | 0,07675 | 1,06 | 0,07909 | 1,18 | 0,10917 | -1,48 | 0,15479 |
| 0,10 | -0,22 | 0,41118 | -0,35 | 0,33437 | 0,76 | 0,19432 | 0,20 | 0,41012 |
| 0,25 | -0,95 | 0,15531 | 0,35 | 0,33448 | 0,91 | 0,22985 | 0,56 | 0,36734 |
| 0,50 | 0,28 | 0,41819 | 0,61 | 0,32353 | 0,60 | 0,36268 | 0,00 | 0,50000 |
| 1,00 | 3,35 (*) | 0,01780 | -0,79 | 0,31232 | 1,11 | 0,10973 | 1,53 | 0,02574 |
| 2,5 | 5,54 | 0,00269 | 9,86 (*) | 0,00006 | 12,68 (*) | 0,00000 | 13,49 (*) | 0,00001 |
| 5,0 | 8,51 | 0,00006 | 13,67 | 0,00000 | 16,29 | 0,00000 | 16,68 | 0,00000 |
| 10,0 | 7,12 | 0,00057 | 16,57 | 0,00002 | 19,55 | 0,00000 | 19,62 | 0,00000 |
| 25,0 | 6,80 | 0,00008 | 17,88 | 0,00000 | 22,12 | 0,00000 | 21,77 | 0,00000 |
| 50,0 | 5,03 | 0,00031 | 17,11 | 0,00000 | 22,03 | 0,00000 | 22,20 | 0,00000 |
| MSD | 0,028 | | 0,052 | | 0,059 | | 0,069 | |
| % reducción | 92,70 | | 17,37 | | 13,40 | | 10,96 | |
| <p><i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola).</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| <i>t=72 h</i> | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,942 | | 0,966 | | 0,966 | | 0,969 | | 0,968 | | 0,966 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 14,47 | |
| B calculado | 3,57 | | 8,03 | | 10,84 | | 11,55 | | 13,20 | | 10,10 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L LINDANO | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,01 | 0,92 | 0,11 | 0,99 | 0,11 | 1,05 | 0,11 | 1,09 | 0,11 | 1,14 | 0,11 | 1,40 | 0,11 |
| 0,10 | 0,59 | 0,19 | 0,64 | 0,19 | 0,68 | 0,19 | 0,70 | 0,19 | 0,74 | 0,19 | 0,90 | 0,19 |
| 0,25 | 0,71 | 0,23 | 0,76 | 0,23 | 0,81 | 0,23 | 0,84 | 0,23 | 0,88 | 0,23 | 1,08 | 0,23 |
| 0,50 | 0,46 | 0,36 | 0,50 | 0,36 | 0,53 | 0,36 | 0,55 | 0,36 | 0,58 | 0,36 | -0,05 | 0,48 |
| 1,00 | 0,86 | 0,11 | 0,93 | 0,11 | 0,98 | 0,11 | 1,02 | 0,11 | 1,07 | 0,11 | 1,31 | 0,11 |
| 2,5 | --- | --- | 10,58(*) | 0,00 | 11,25(*) | 0,00 | 11,68(*) | 0,00 | 12,21(*) | 0,00 | 14,97(*) | 0,00 |
| 5,0 | --- | --- | --- | --- | 14,45 | 0,00 | 15,01 | 0,00 | 15,69 | 0,00 | 19,23 | 0,00 |
| 10,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 18,02 | 0,00 | 18,83 | 0,00 | 23,09 | 0,00 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 21,30 | 0,00 | 26,11 | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 26,00 | 0,00 |
| MSD | 0,072 | | 0,067 | | 0,064 | | 0,062 | | 0,060 | | 0,059 | |
| % reducción | 16,39 | | 15,39 | | 14,64 | | 14,21 | | 13,70 | | 13,40 | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | | | | | |

Tabla A V.21.
Valores de ICp del ensayo de *T. chuii* y LINDANO a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de LINDANO estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|--------------------------|-------------|--------------------------|--------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf | Valor medio | Lim. Conf. Original. Inf | Lim. Conf. Expandido Inf | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,7462 | -0,8195 | 0,0006 | 0,5105 | 1,0803 | 1,4478 | 0,4292 |
| | 25 | 1,4950 | 1,1746 | 1,3424 | 1,4714 | 1,5673 | 1,6468 | 0,0577 |
| | 50 | 2,1337 | 1,9918 | 2,0662 | 2,1244 | 2,1754 | 2,2212 | 0,0293 |
| | 75 | 3,9549 | 3,5300 | 3,7526 | 3,9544 | 4,1363 | 4,3358 | 0,0997 |
| | 95 | 8,7213 | 8,0881 | 8,4198 | 8,8588 | 9,8742 | 11,1424 | 0,3586 |
| 96 | 5 | 0,5885 | -0,6339 | 0,0064 | 0,4054 | 0,9503 | 1,3482 | 0,3174 |
| | 25 | 1,4937 | 1,2751 | 1,3896 | 1,4902 | 1,5875 | 1,6906 | 0,0519 |
| | 50 | 2,2721 | 2,0943 | 2,1874 | 2,2724 | 2,3649 | 2,4671 | 0,0452 |
| | 75 | 7,0489 | 5,6118 | 6,3646 | 7,0192 | 7,7347 | 8,4891 | 0,3430 |
| | 95 | (*) | | | | | | |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

(*) No es posible realizar la interpolación lineal del conjunto de datos para este porcentaje de respuesta

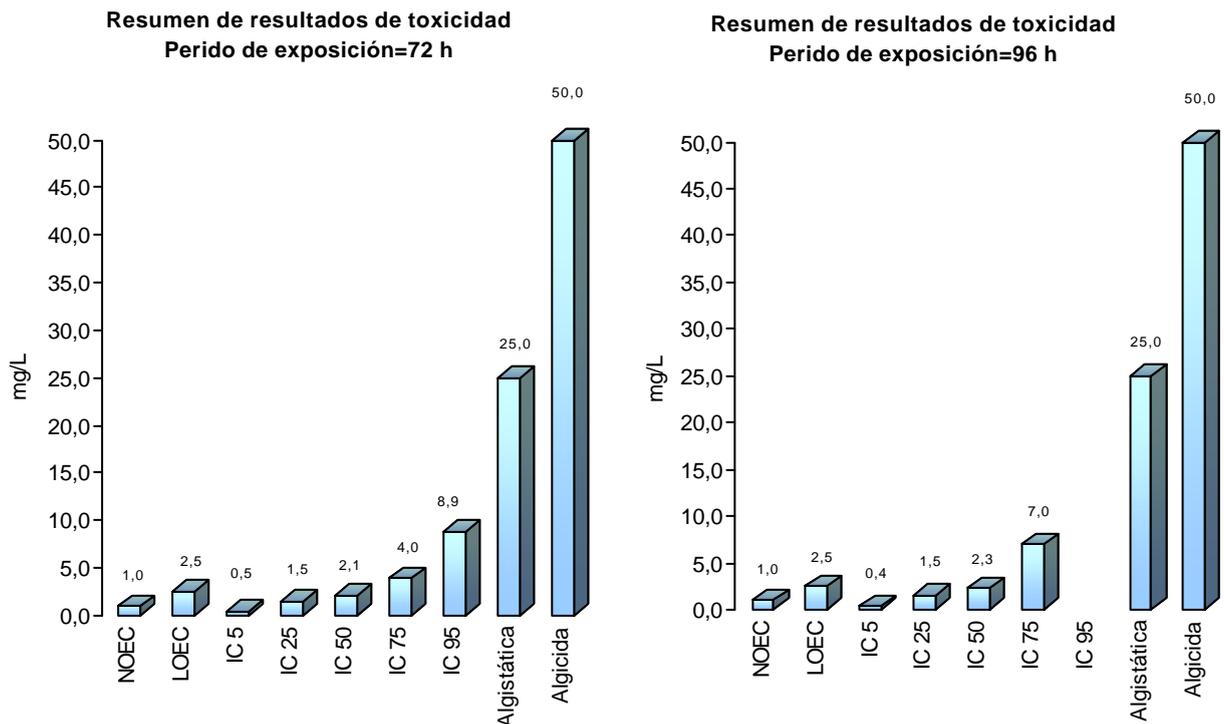
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de *lindano* ensayadas con *T. chuii* (50, 25, 10 y 5 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo de tiempo se observó un aumento considerable de la biomasa en los viales correspondientes a 5, 10 y 25 mg/L, y no se observó cambio alguno en el vial que ensaya la concentración alguistática de 50 mg/L.

- Concentración alguistática= 25 mg/L
- Concentración alguicida= 50 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de *lindano* y *T. chuii*.



3. RESULTADOS CON *ARTEMIA*

3.1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Recipiente de ensayo: placas petri de vidrio
- N° de réplicas: 5 para cada concentración y control
- N° de organismos por placa: 10
- Volumen de las placas: 30 mL
- Volumen de solución de ensayo: 20 mL
- Agua de dilución: agua de mar sintética
- Medio nutriente adicional: no
- Temperatura de ensayo: $20 \pm 0,1$ °C
- Iluminación: no, oscuridad
- Aireación: no
- Duración del ensayo: 3 días
- Respuesta observada: mortalidad, inhibición en la capacidad natatoria

ORGANISMOS DE ENSAYO

- *Artemia franciscana*, código 1309 según clasificación del Instituto de la *Artemia*, Bélgica obtenidos a partir de la eclosión de quistes de resistencia en condiciones óptimas de luz (iluminación constante), aireación (continua) y temperatura ($20 \pm 0,1$ °C).
- Nauplios de una misma cohorte de *Artemia franciscana* de entre 6 a 12 horas de vida (estadio I)

RESULTADOS OBTENIDOS

- Número de supervivientes a las 24, 48 y 72 horas de ensayo
- LC_p mediante el método Probit

3.2 RESULTADOS OBTENIDOS

Tabla A V.22.
Ensayos de toxicidad aguda con *Artemia*. Ensayo de LINDANO.

| mg/L g-C ₆ H ₆ Cl ₆ | 24 h | | | 48 h | | | 72 h | | | N Total |
|--|------|---|----|------|---|----|------|---|----|---------|
| | + | ± | - | + | ± | - | + | ± | - | |
| 0,000 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| 0,010 | 8 | 2 | 0 | 4 | 3 | 3 | 4 | 1 | 5 | 10 |
| | 5 | 3 | 2 | 2 | 3 | 5 | 1 | 4 | 5 | 10 |
| | 5 | 0 | 5 | 4 | 1 | 5 | 2 | 1 | 7 | 10 |
| | 5 | 1 | 4 | 4 | 2 | 4 | 3 | 2 | 5 | 10 |
| | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 0 | 8 | 10 |
| 0,025 | 3 | 3 | 4 | 2 | 3 | 5 | 2 | 1 | 7 | 10 |
| | 8 | 1 | 1 | 4 | 3 | 3 | 3 | 3 | 6 | 10 |
| | 7 | 2 | 1 | 7 | 0 | 3 | 3 | 2 | 5 | 10 |
| | 2 | 4 | 4 | 1 | 3 | 6 | 2 | 1 | 7 | 10 |
| | 2 | 5 | 3 | 1 | 3 | 6 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| 0,05 | 6 | 1 | 3 | 3 | 2 | 5 | 1 | 2 | 7 | 10 |
| | 6 | 1 | 3 | 4 | 1 | 5 | 1 | 1 | 8 | 10 |
| | 3 | 1 | 6 | 1 | 2 | 7 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 5 | 2 | 3 | 2 | 3 | 5 | 2 | 2 | 6 | 10 |
| | 7 | 1 | 2 | 6 | 0 | 4 | 2 | 1 | 7 | 10 |
| 0,10 | 6 | 1 | 3 | 4 | 1 | 5 | 2 | 2 | 6 | 10 |
| | 7 | 0 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 0 | 8 | 10 |
| | 5 | 0 | 5 | 3 | 0 | 7 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 3 | 2 | 3 | 2 | 2 | 6 | 0 | 1 | 9 | 10 |
| | 4 | 1 | 5 | 1 | 3 | 6 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| 0,50 | 4 | 3 | 3 | 3 | 1 | 6 | 1 | 1 | 8 | 10 |
| | 4 | 6 | 4 | 1 | 1 | 8 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 5 | 1 | 4 | 4 | 0 | 6 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| | 1 | 1 | 8 | 1 | 2 | 7 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| | 1 | 4 | 5 | 0 | 2 | 8 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| 1,0 | 2 | 3 | 5 | 2 | 2 | 6 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 4 | 2 | 4 | 2 | 2 | 6 | 1 | 1 | 8 | 10 |
| | 2 | 4 | 4 | 1 | 2 | 7 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| | 3 | 2 | 5 | 1 | 3 | 6 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 1 | 3 | 4 | 0 | 4 | 6 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| 2,5 | 0 | 4 | 6 | 0 | 3 | 7 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 5 | 5 | 1 | 1 | 8 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 4 | 3 | 3 | 2 | 0 | 8 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 1 | 5 | 4 | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 5 | 5 | 2 | 1 | 7 | 0 | 1 | 9 | 10 |
| 5,0 | 0 | 4 | 6 | 2 | 1 | 7 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 1 | 2 | 7 | 1 | 2 | 7 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 1 | 9 | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 2 | 8 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 2 | 1 | 7 | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| 10,0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 3 | 7 | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 2 | 8 | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 1 | 3 | 6 | 1 | 1 | 8 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| 25,0 | 3 | 0 | 7 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 2 | 8 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 1 | 0 | 9 | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |

Tabla A V.23.
Promedios de supervivientes. Ensayo de LINDANO.

| mg/L g-C ₆ H ₆ Cl ₆ | 24 h | | 48 h | | 72 h | | Promedio DesvEst |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------------------|
| | + Total | ± | + Total | ± | + Total | ± | |
| 0,000 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 0,010 | 7,0 | 1,8 | 5,8 | 2,4 | 4,0 | 1,6 | Promedio DesvEst |
| | 2,00 | 1,30 | 0,84 | 0,89 | 1,41 | 1,52 | |
| 0,025 | 7,4 | 3,0 | 5,4 | 2,4 | 3,6 | 1,4 | Promedio DesvEst |
| | 1,52 | 1,58 | 1,52 | 1,34 | 1,95 | 1,14 | |
| 0,05 | 6,6 | 1,2 | 4,8 | 1,6 | 2,4 | 1,2 | Promedio DesvEst |
| | 1,52 | 0,45 | 1,10 | 1,14 | 1,52 | 0,84 | |
| 0,10 | 5,8 | 0,8 | 4,2 | 1,6 | 1,6 | 0,6 | Promedio DesvEst |
| | 1,10 | 0,84 | 0,84 | 1,14 | 1,52 | 0,89 | |
| 0,50 | 6,0 | 3,0 | 3,0 | 1,2 | 0,8 | 0,2 | Promedio DesvEst |
| | 2,92 | 2,12 | 1,00 | 0,84 | 0,84 | 0,45 | |
| 1,0 | 5,2 | 2,8 | 3,8 | 2,6 | 0,6 | 0,2 | Promedio DesvEst |
| | 0,84 | 0,84 | 0,45 | 0,89 | 0,89 | 0,45 | |
| 2,5 | 5,4 | 4,4 | 2,2 | 1,0 | 0,2 | 0,2 | Promedio DesvEst |
| | 1,14 | 0,89 | 0,84 | 1,22 | 0,45 | 0,45 | |
| 5,0 | 2,6 | 2,0 | 1,6 | 0,8 | 0,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 1,14 | 1,22 | 1,34 | 0,84 | 0,00 | 0,00 | |
| 10,0 | 2,0 | 1,8 | 0,8 | 0,4 | 0,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 1,58 | 1,30 | 0,84 | 0,55 | 0,00 | 0,00 | |
| 25,0 | 1,6 | 0,8 | 0,2 | 0,2 | 0,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,89 | 0,84 | 0,45 | 0,45 | 0,00 | 0,00 | |

+ Total: Número total de supervivientes; ±: Número de organismos que presentan un descenso en la capacidad natatoria

Variación del número de supervivientes

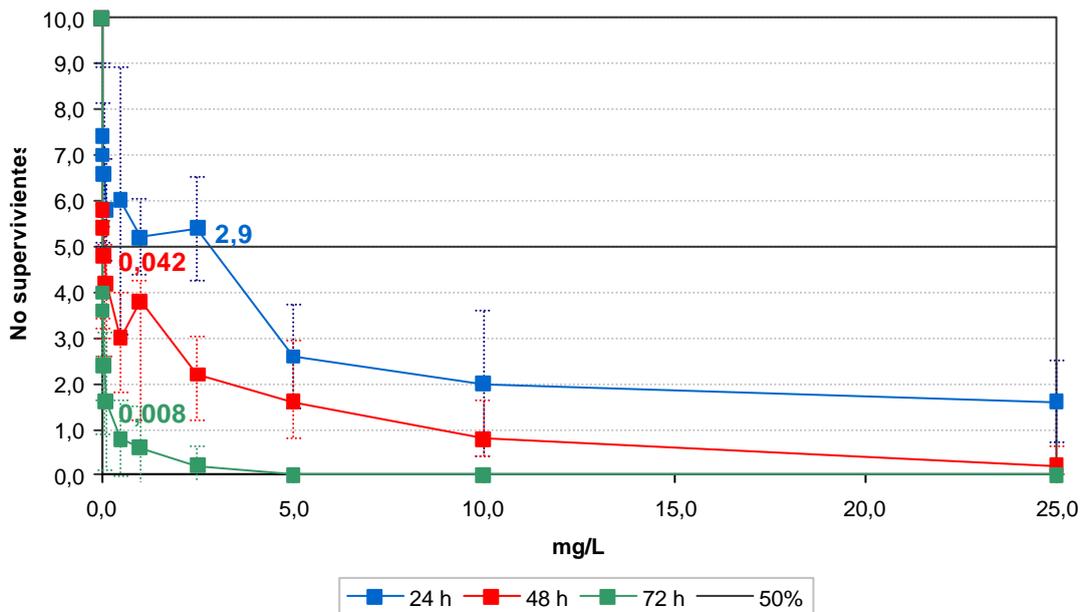


Tabla A V.24.
Resultados obtenidos mediante el método PROBIT

| Ensayo de 24 h | Concentración estimada de Lindano (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|--|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| LC/EC 5,00 | 0,000 | 0,000 | 0,001 |
| LC/EC 10,00 | 0,001 | 0,000 | 0,003 |
| LC/EC 15,00 | 0,003 | 0,000 | 0,008 |
| LC/EC 50,00 | 0,500 | 0,272 | 0,910 |
| LC/EC 85,00 | 98,553 | 31,808 | 568,448 |
| LC/EC 90,00 | 343,981 | 89,461 | 2858,253 |
| LC/EC 95,00 | 2192,128 | 409,005 | 31669,371 |
| LC/EC 99,00 | 70706,625 | 6944,789 | 2936959,000 |

χ^2 calculado=13,970; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. Se cumple la condición de homogeneidad de la varianza.

| Ensayo de 48 h | Concentración estimada de Lindano (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|--|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| LC/EC 5,00 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| LC/EC 10,00 | 0,000 | 0,000 | 0,001 |
| LC/EC 15,00 | 0,000 | 0,000 | 0,001 |
| LC/EC 50,00 | 0,044 | 0,019 | 0,083 |
| LC/EC 85,00 | 4,906 | 2,390 | 13,575 |
| LC/EC 90,00 | 14,975 | 6,244 | 54,703 |
| LC/EC 95,00 | 78,251 | 25,085 | 445,359 |
| LC/EC 99,00 | 1739,294 | 326,678 | 23707,854 |

χ^2 calculado=8,941; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. Se cumple la condición de homogeneidad de la varianza.

| Ensayo de 72 h | Concentración estimada de Lindano (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|--|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| LC/EC 5,00 | 0,000 | 0,000 | 0,000 |
| LC/EC 10,00 | 0,000 | 0,000 | 0,001 |
| LC/EC 15,00 | 0,000 | 0,000 | 0,001 |
| LC/EC 50,00 | 0,006 | 0,002 | 0,012 |
| LC/EC 85,00 | 0,122 | 0,076 | 0,211 |
| LC/EC 90,00 | 0,252 | 0,152 | 0,492 |
| LC/EC 95,00 | 0,732 | 0,390 | 1,877 |
| LC/EC 99,00 | 5,427 | 2,072 | 25,591 |

χ^2 calculado=1,855; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. Se cumple la condición de homogeneidad de la varianza.

4. ENSAYOS CON BACTERIAS LUMINISCENTES

4.1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Condiciones del ensayo LUMISTOX
- N° de réplicas: 2 para cada concentración y control
- Duración del ensayo: 30 minutos
- Respuesta observada: luminiscencia de las bacterias

ORGANISMOS DE ENSAYO

- Bacterias luminiscentes proporcionadas por la marca comercial *Dr. Lange* para el ensayo de LUMISTOX

RESULTADOS OBTENIDOS

- Inhibición de la luminiscencia a t=15 min, y t=30 min.

4.2. RESULTADOS OBTENIDOS

Tabla V.25.

Resultados obtenidos en el ensayo de bacterias luminiscentes y LINDANO

| mg/L | Luminiscencia | | | t=15 min | | | t=30 min | | |
|-------|---------------|-------|-------|----------|-------|-------|----------|-------|-------|
| | t=0 | t=15 | t=30 | Icorr | %H | Gamma | Icorr | %H | Gamma |
| 50,0 | 885,2 | 0,0 | 0,0 | 864,8 | 100,0 | --- | 840,1 | 100,0 | --- |
| | 887,9 | 0,0 | 0,0 | 867,5 | 100,0 | --- | 842,7 | 100,0 | --- |
| 25,0 | 886,4 | 23,6 | 22,6 | 866,0 | 97,3 | 35,7 | 841,3 | 97,3 | 36,2 |
| | 899,0 | 22,5 | 21,6 | 878,3 | 97,4 | 38,0 | 853,2 | 97,5 | 38,5 |
| 12,50 | 899,8 | 156,5 | 163,3 | 879,1 | 82,2 | 4,6 | 854,0 | 80,9 | 4,2 |
| | 952,3 | 147,1 | 154,5 | 930,4 | 84,2 | 5,3 | 903,8 | 82,9 | 4,8 |
| 6,250 | 960,5 | 367,8 | 401,8 | 938,4 | 60,8 | 1,6 | 911,6 | 55,9 | 1,3 |
| | 957,1 | 379,8 | 413,3 | 935,1 | 59,4 | 1,5 | 908,4 | 54,5 | 1,2 |
| 3,125 | 971,4 | 597,1 | 656,6 | 949,0 | 37,1 | 0,6 | 921,9 | 28,8 | 0,4 |
| | 961,7 | 595,1 | 661,9 | 939,6 | 36,7 | 0,6 | 912,7 | 27,5 | 0,4 |
| 1,563 | 973,1 | 760,2 | 758,5 | 950,7 | 20,0 | 0,3 | 923,5 | 17,9 | 0,2 |
| | 974,5 | 763,9 | 791,0 | 952,1 | 19,8 | 0,2 | 924,9 | 14,5 | 0,2 |
| 0,781 | 957,9 | 849,1 | 836,7 | 935,8 | 9,3 | 0,1 | 909,1 | 8,0 | 0,1 |
| | 996,7 | 875,5 | 860,0 | 973,8 | 10,1 | 0,1 | 945,9 | 9,1 | 0,1 |
| 0,391 | 967,3 | 868,2 | 839,3 | 945,0 | 8,1 | 0,1 | 918,0 | 8,6 | 0,1 |
| | 977,0 | 880,0 | 833,6 | 954,5 | 7,8 | 0,1 | 927,2 | 10,1 | 0,1 |
| 0,195 | 939,7 | 927,5 | 884,5 | 918,1 | -1,0 | 0,0 | 891,8 | 0,8 | 0,0 |
| | 996,2 | 900,6 | 859,8 | 973,3 | 7,5 | 0,1 | 945,5 | 9,1 | 0,1 |
| 0,000 | 1010,0 | 995,0 | 972,3 | 986,7 | -0,8 | 0,0 | 958,6 | -1,4 | 0,0 |
| | 1029,0 | 996,9 | 962,6 | 1005,3 | 0,8 | 0,0 | 976,6 | 1,4 | 0,0 |
| | | | | KF=0,977 | | | KF=0,949 | | |

Tabla V.26.
Promedio de los valores de %H del ensayo de LINDANO

| | mg/L γ -C ₆ H ₆ Cl ₆ | | | | | | | | | | |
|----------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|-------|----------|
| | 0,000 | 0,195 | 0,391 | 0,781 | 1,563 | 3,125 | 6,250 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | |
| t=15 min | 0,0 | 3,3 | 8,0 | 9,7 | 19,9 | 36,9 | 60,1 | 83,2 | 97,4 | 100,0 | Promedio |
| | 1,13 | 6,01 | 0,21 | 0,57 | 0,14 | 0,28 | 0,99 | 1,41 | 0,07 | 0,00 | DesvEst |
| t=30 min | 0,0 | 5,0 | 9,4 | 8,6 | 16,2 | 28,2 | 55,2 | 81,9 | 97,4 | 100,0 | Promedio |
| | 1,98 | 5,87 | 1,06 | 0,78 | 2,40 | 0,92 | 0,99 | 1,41 | 0,14 | 0,00 | DesvEst |

Variación del porcentaje de inhibición con la concentración de ensayo

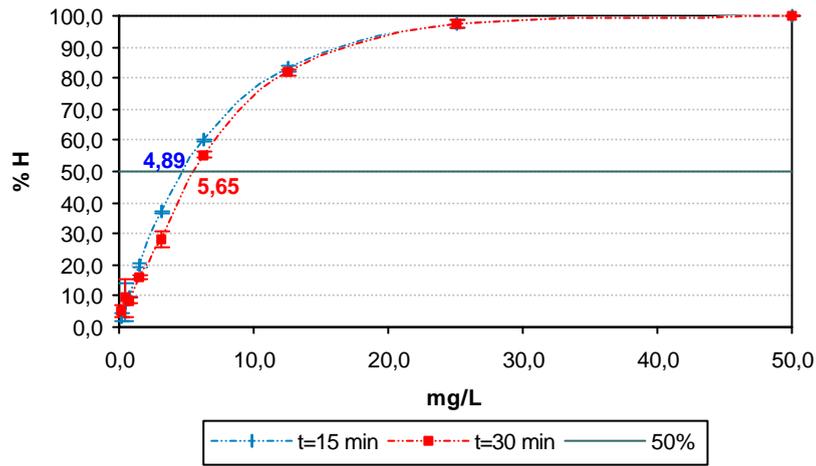


Tabla A V.27.
Valores de EC(p) calculados mediante interpolación gráfica

| Lindano (mg/L) | t=15 min | t=30 min |
|------------------|----------|----------|
| EC ₅ | 1,29 | 2,19 |
| EC ₂₅ | 3,42 | 6,95 |
| EC ₅₀ | 5,30 | 8,59 |

5. OBJETIVOS DE CALIDAD DEL LINDANO. TABLAS DE CÁLCULO. RESULTADOS

Tabla A V.28. Tabla resumen de los resultados de toxicidad más sensibles (Fact. Seg.=100)

| Resumen de resultados más sensibles de cada grupo de organismos | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos del presente estudio | | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos de toxicidad en agua de mar | | | Valor mínimo obtenidos a partir de la base de datos de toxicidad acuática | | |
|---|-----------------------------|---|-------|---------|--|---------|-----------|---|---------|-----------|
| | | Nº datos | mg/L | x FS | Nº datos | mg/L | x FS | Nº datos | mg/L | x FS |
| Microalgas | NOEC (≤ 96 h) | 10 | 0,01 | 0,0001 | 10 | 0,01 | 0,0001 | 10 | 0,01 | 0,0001 |
| | LOEC (≤ 96 h) | 10 | 0,1 | 0,001 | 10 | 0,1 | 0,001 | 10 | 0,1 | 0,001 |
| | IC ₅₀ (≤ 96 h) | 10 | 2,124 | 0,02124 | 15 | 1,92 | 0,0192 | 15 | 1,92 | 0,0192 |
| Crustáceos | LOEC (120 d) | | | | | | | 4 | 0,0043 | 0,00043 |
| | NOEC (60 d) | | | | | | | 2 | 0,0022 | 0,00022 |
| | EC ₅₀ (≤ 96 h) | 3 | 0,006 | 0,00006 | 23 | 0,00004 | 0,0000004 | 49 | 0,00004 | 0,0000004 |
| Bacterias | EC ₃₀ (≤ 30 min) | 2 | 5,30 | 0,0530 | 2 | 5,30 | 0,0530 | 2 | 5,30 | 0,053 |
| Otros invertebrados | LC ₅₀ (≤ 96 h) | | | | | | | 1 | 7,3 | 0,073 |
| Peces | NOEC (261 d) | | | | | | | 5 | 0,00088 | 0,0088 |
| | LOEC (55 d) | | | | | | | 5 | 0,0125 | 0,00125 |
| | EC ₅₀ (≤ 96 h) | | | | 11 | 0,009 | 0,00009 | 13 | 0,009 | 0,00009 |
| | EC ₅₀ (8 d) | | | | | | | 3 | 0,058 | 0,0058 |

Tabla A V.29. Valores ecotoxicológicos obtenidos a partir de los valores L(E)C₅₀

| Valor guía obtenido a partir de los valores de L(E)C ₅₀ | Grupo de organismos | Tipo de Respuesta (Aguda o Crónica) | n _i , N | w _i = n _i /N | q _i = Conc- F S | w _i x q _i | Valor Guía = $\sum_{i=1}^n q_i w_i$ |
|--|---------------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Base de datos de toxicidad de este estudio | Algas | A | 10 | 0,6667 | 0,02124 | 0,0142 | 0,0212 mg/L Lindano |
| | crustáceos | A | 3 | 0,2000 | 0,00006 | 0,0000 | |
| | Peces | A | 2 | 0,1333 | 0,053 | 0,0071 | |
| | N total de datos | | 15 | | | | |
| Base de datos de toxicidad en agua de mar | Algas | A | 15 | 0,2941 | 0,0192 | 0,0056 | 0,077 mg/L Lindano |
| | Crustáceos | A | 23 | 0,4510 | 0,0000004 | 0,0000 | |
| | Bacterias | A | 2 | 0,0392 | 0,053 | 0,0021 | |
| | peces | A | 11 | 0,2157 | 0,00009 | 0,0000 | |
| N total de datos | | 51 | | | | | |
| Base de toxicidad acuática | Algas | A | 15 | 0,2632 | 0,0192 | 0,0051 | 0,0085 mg/L Lindano |
| | Crustáceos | A | 23 | 0,4035 | 4,00E-07 | 0,0000 | |
| | Bacterias | A | 2 | 0,0351 | 0,053 | 0,0019 | |
| | Otros invertebrados | A | 1 | 0,0175 | 0,073 | 0,0013 | |
| | peces | A | 13 | 0,2281 | 0,00009 | 0,0000 | |
| | peces | C | 3 | 0,0526 | 0,0058 | 0,0003 | |
| N total de datos | | 57 | | | | | |

Tabla A V.30. Valores ecotoxicológicos obtenidos a partir de los valores NOEC/LOEC

| Valor guía obtenido a partir de los valores NOEC/LOEC | Grupo de organismos | Tipo de Respuesta (Aguda o Crónica) | n_i, N | $w_i = n_i/N$ | $q_i = \text{Conc} \cdot F \cdot S$ | $w_i \times q_i$ | Valor Guía = $\sum_{i=1}^n q_i \cdot w_i$ |
|---|---------------------|-------------------------------------|----------|---------------|-------------------------------------|------------------|---|
| Base de datos de toxicidad de este estudio | Algas | A (NOEC) | 10 | 0,5000 | 0,0001 | 0,0001 | 0,006 mg/L Lindano |
| | Algas | A (LOEC) | 10 | 0,5000 | 0,001 | 0,0005 | |
| | N total de datos | | | 20 | | | |
| Base de datos de toxicidad en agua de mar | Algas | A (NOEC) | 10 | 0,5000 | 0,0001 | 0,0001 | 0,006 mg/L Lindano |
| | Algas | A (LOEC) | 10 | 0,5000 | 0,001 | 0,0005 | |
| | N total de datos | | | 20 | | | |
| Base de toxicidad acuática | Algas | A (NOEC) | 10 | 0,2778 | 0,0001 | 0,00003 | 0,0007 mg/L LAS |
| | Algas | A (LOEC) | 10 | 0,2778 | 0,0010 | 0,00028 | |
| | Crustáceos | C (LOEC) | 4 | 0,1111 | 0,0004 | 0,00005 | |
| | Crustáceos | C (NOEC) | 2 | 0,0556 | 0,0002 | 0,00001 | |
| | peces | C (NOEC) | 5 | 0,1389 | 0,0009 | 0,00012 | |
| | peces | C (LOEC) | 5 | 0,1389 | 0,0013 | 0,00017 | |
| | Algas | A (NOEC) | 10 | 0,2778 | 0,0001 | 0,00003 | |
| N total de datos | | | 46 | | | | |

ANEXO VI. COBRE (II)

1. DATOS DE REFERENCIA

1.1. PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS

- Suministro: SCHARLAU
- Nombre del producto: Sulfato de cobre
- Número del producto: 7758-98-7
- Fórmula empírica: CuSO_4
- Peso molecular: 159,61 g/mol
- Apariencia: piedra azul

1.2. DATOS DE TOXICIDAD DE REFERENCIA

La siguiente tabla muestra algunos resultados de toxicidad obtenidos de la bibliografía:

Tabla A VI.1a.
Datos de toxicidad del Cobre (II) en algunos grupos de organismos. Algas

| Especies | Medio | Tiempo Exposición (h) | Expresión de toxicidad | Cobre (II) (mg/L) | Referencia |
|-------------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|-------------------|--------------------------------------|
| <i>Aphanizomenon graciles</i> | Agua dulce | --- | EC100 | 0,02 | Moreno Garrido (1997) ⁽¹⁾ |
| <i>Aphanizomenon graciles</i> | Agua dulce | --- | EC100 | 0,064 | Moreno Garrido (1997) ⁽¹⁾ |
| <i>Oscillatoria redekei</i> | Agua dulce | --- | EC100 | 0,02 | Moreno Garrido (1997) ⁽¹⁾ |
| <i>Oscillatoria redekei</i> | Agua dulce | --- | EC100 | 0,08 | Moreno Garrido (1997) ⁽¹⁾ |
| <i>R. salina</i> | Agua salada | 72 | EC50 | 0,070 | Moreno Garrido (1997) |

Tabla A VI.1b.
Datos de toxicidad del Cobre (II) en algunos grupos de organismos. Crustáceos

| Especies | Medio | Tiempo Exposición (h) | Expresión de toxicidad | Cobre (II) (mg/L) | Referencia |
|-----------------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|-------------------|-----------------------------------|
| <i>Carcinides maenas</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,6 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Carcinides maenas</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 109 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Homarus americanus</i> | Agua dulce | 13 d | EC50 | 0,056 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Homarus americanus</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,1 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Pandalus montagui</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,14 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Paragrapsus quadridentatus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,17 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Cancer magister</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 0,049 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Hydropsyche angustipennis</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 0,1 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Penaeus aztecus</i> | Agua salada | 48 | EC50 | 0,33 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Penaeus aztecus</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 19 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Penaeus californicus</i> | Agua salada | 1 | EC50 | 250 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Protothaca staminea</i> | Agua salada | 30 | NOEC | 0,018 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Protothaca staminea</i> | Agua salada | 17 | EC50 | 0,039 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Protothaca staminea</i> | Agua salada | 30 | LOEC | 0,039 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Protothaca staminea</i> | Agua salada | 12 | EC50 | 0,082 | ECETOC ⁽¹⁾ |

Tabla A VI.1c.
Datos de toxicidad del Cobre (II) en algunos grupos de organismos. Peces

| <i>Especies</i> | <i>Medio</i> | <i>Tiempo Exposición (h)</i> | <i>Expresión de toxicidad</i> | <i>Cobre (II) (mg/L)</i> | <i>Referencia</i> |
|----------------------------------|--------------|------------------------------|-------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| <i>Agosia chrysogaster</i> | Agua dulce | 96 | NOEC | 1,3 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Agosia chrysogaster</i> | Agua dulce | 96 | LOEC | 1,8 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,062 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> | Agua dulce | 72 | EC50 | 0,065 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> | Agua dulce | 72 | EC50 | 0,24 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,265 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Chaarogobius heptacanthus</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 6,5 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Ictalurus punctatus</i> | Agua dulce | 30 | NOEC | 0,012 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Ictalurus punctatus</i> | Agua dulce | 60 | NOEC | 0,012 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Ictalurus punctatus</i> | Agua dulce | 30 | LOEC | 0,018 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Ictalurus punctatus</i> | Agua dulce | 60 | LOEC | 0,018 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 270 | NOEC | 0,019 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 270 | LOEC | 0,029 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 30 | NOEC | 0,0441 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 30 | LOEC | 0,0718 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 30 | NOEC | 0,0718 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 60 | LOEC | 0,1194 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,21 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,22 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,27 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 28 | EC50 | 0,123 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,25 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 9 | NOEC | 0,338 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 9 | LOEC | 0,62 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 0,14 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,4 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 30 | NOEC | 0,004 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 30 | LOEC | 0,013 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 60 | NOEC | 0,013 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 60 | LOEC | 0,027 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Stizostedion vitreum</i> | Agua dulce | 30 | NOEC | 0,008 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Stizostedion vitreum</i> | Agua dulce | 30 | LOEC | 0,013 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Therapon jarbua</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 4 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Trachinotus carolinus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 2 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Fundulus heteroclitus</i> | Agua salada | 7 d | EC50 | 1 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Fundulus heteroclitus</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 3,1 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Platichthys flesus</i> | Agua salada | 48 | EC50 | 1 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |

¹ Referencias recogidas en los documentos indicados pero no pertenecientes a estos autores

2. ENSAYOS DE MICROALGAS MARINAS

RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Volumen de los viales de ensayo: 15 mL
- Volumen de solución de ensayo: 4 mL
- Agua de dilución: mezcla acetona+agua de mar sintética (acetona al 1,25% (v/v))
- Medio nutriente adicional: si, medio f/2 sin AEDT-Na₂
- Temperatura de ensayo: 20 ± 0,1 °C
- Iluminación: constante, 11000 lux
- Aireación: diaria -de forma manual-
- Duración del ensayo: 10 días (+ 10 para el estudio de la concentración alguistática y alguicida)
- Medidas de biomasa: turbidez, a $\lambda = 690$ nm

MICROALGAS ENSAYADAS

- *Nannochloropsis gaditana*
- *Isochrysis galbana*
- *Dunaliella salina*
- *Chaetoceros gracilis*
- *Tetraselmis chuii*

RESULTADOS OBTENIDOS

- Valores de biomasa (Abs, 690 nm) de cada tratamiento
- Valores experimentales de NOEC y LOEC
- Valores experimentales de inhibición calculados a partir del ICp programa (Las indicaciones inferiores de las tablas (*) y (**)) están referidas a indicaciones realizadas por el programa
- Concentraciones alguistáticas y alguicidas experimentales

2.1. *Nannochloropsis gaditana*

Tabla A VI.2.

Evolución de la biomasa de *Nannochloropsis gaditana*. Ensayo de COBRE (II).

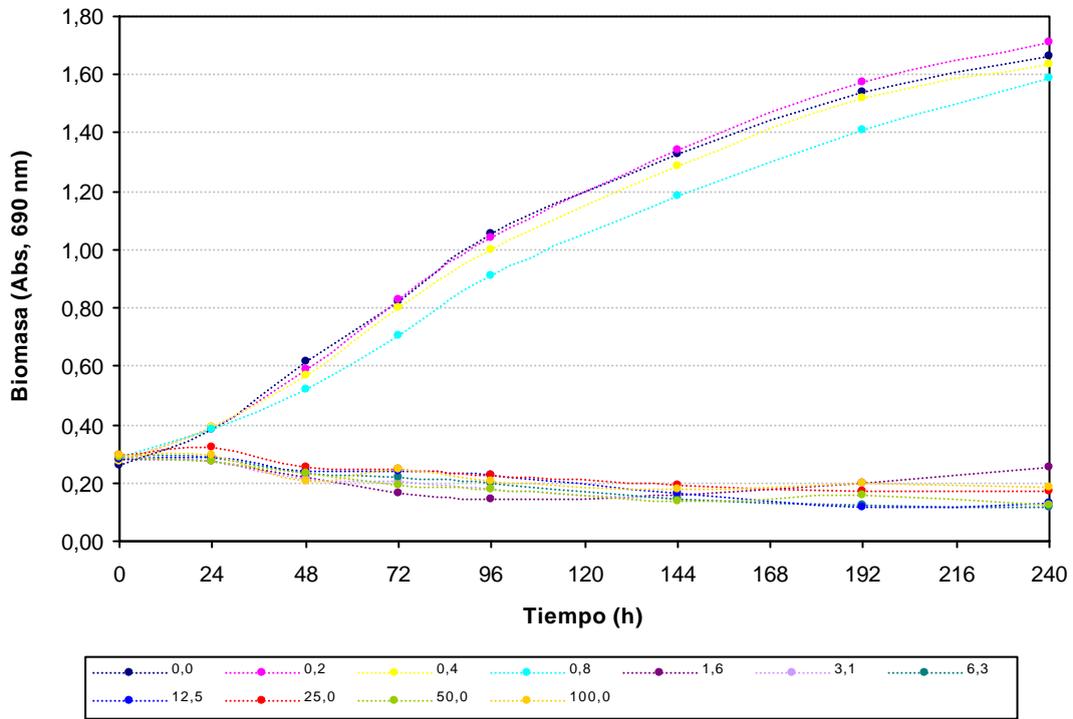
| | | <i>N. gaditana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | Abs´ = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | |
|--------------|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| t(d) | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| t(h) | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| 0,0 | | 0,256 | 0,396 | 0,636 | 0,850 | 1,080 | | | | 0,000 | 0,140 | 0,380 | 0,594 | 0,824 | | | |
| | | 0,268 | 0,393 | 0,615 | 0,825 | 1,067 | 1,327 | 1,542 | 1,664 | 0,000 | 0,125 | 0,347 | 0,557 | 0,799 | 1,059 | 1,274 | 1,396 |
| | | 0,253 | 0,364 | 0,593 | 0,784 | 1,024 | | | | 0,000 | 0,111 | 0,340 | 0,531 | 0,771 | | | |
| 0,2 | | 0,254 | 0,403 | 0,646 | 0,866 | 0,995 | | | | 0,000 | 0,149 | 0,392 | 0,612 | 0,741 | | | |
| | | 0,284 | 0,403 | 0,590 | 0,837 | 1,068 | 1,343 | 1,576 | 1,709 | 0,000 | 0,119 | 0,306 | 0,553 | 0,784 | 1,059 | 1,292 | 1,425 |
| | | 0,276 | 0,369 | 0,526 | 0,778 | 1,056 | | | | 0,000 | 0,093 | 0,250 | 0,502 | 0,780 | | | |
| 0,4 | | 0,271 | 0,409 | 0,622 | 0,854 | 1,027 | | | | 0,000 | 0,138 | 0,351 | 0,583 | 0,756 | | | |
| | | 0,278 | 0,388 | 0,551 | 0,789 | 1,005 | 1,289 | 1,517 | 1,633 | 0,000 | 0,110 | 0,273 | 0,511 | 0,727 | 1,011 | 1,239 | 1,355 |
| | | 0,271 | 0,369 | 0,530 | 0,753 | 0,970 | | | | 0,000 | 0,098 | 0,259 | 0,482 | 0,699 | | | |
| 0,8 | | 0,291 | 0,413 | 0,567 | 0,773 | 0,937 | | | | 0,000 | 0,122 | 0,276 | 0,482 | 0,646 | | | |
| | | 0,290 | 0,380 | 0,505 | 0,676 | 0,923 | 1,186 | 1,413 | 1,588 | 0,000 | 0,090 | 0,215 | 0,386 | 0,633 | 0,896 | 1,123 | 1,298 |
| | | 0,285 | 0,363 | 0,496 | 0,660 | 0,881 | | | | 0,000 | 0,078 | 0,211 | 0,375 | 0,596 | | | |
| 1,6 | | 0,273 | 0,280 | 0,216 | 0,169 | 0,143 | | | | 0,000 | 0,007 | -0,057 | -0,104 | -0,130 | | | |
| | | 0,277 | 0,268 | 0,240 | 0,181 | 0,160 | 0,158 | 0,196 | 0,256 | 0,000 | -0,009 | -0,037 | -0,096 | -0,117 | -0,119 | -0,081 | -0,021 |
| | | 0,283 | 0,272 | 0,202 | 0,153 | 0,136 | | | | 0,000 | -0,011 | -0,081 | -0,130 | -0,147 | | | |
| 3,1 | | 0,277 | 0,263 | 0,223 | 0,200 | 0,169 | | | | 0,000 | -0,014 | -0,054 | -0,077 | -0,108 | | | |
| | | 0,291 | 0,286 | 0,214 | 0,209 | 0,185 | 0,141 | 0,123 | 0,118 | 0,000 | -0,005 | -0,077 | -0,082 | -0,106 | -0,150 | -0,168 | -0,173 |
| | | 0,292 | 0,275 | 0,202 | 0,199 | 0,189 | | | | 0,000 | -0,017 | -0,090 | -0,093 | -0,103 | | | |
| 6,3 | | 0,298 | 0,295 | 0,233 | 0,236 | 0,215 | | | | 0,000 | -0,003 | -0,065 | -0,062 | -0,083 | | | |
| | | 0,290 | 0,298 | 0,250 | 0,223 | 0,204 | 0,147 | 0,124 | 0,115 | 0,000 | 0,008 | -0,040 | -0,067 | -0,086 | -0,143 | -0,166 | -0,175 |
| | | 0,285 | 0,273 | 0,222 | 0,203 | 0,186 | | | | 0,000 | -0,012 | -0,063 | -0,082 | -0,099 | | | |
| 12,5 | | 0,284 | 0,308 | 0,249 | 0,271 | 0,252 | | | | 0,000 | 0,024 | -0,035 | -0,013 | -0,032 | | | |
| | | 0,276 | 0,273 | 0,220 | 0,212 | 0,201 | 0,161 | 0,116 | 0,128 | 0,000 | -0,003 | -0,056 | -0,064 | -0,075 | -0,115 | -0,160 | -0,148 |
| | | 0,279 | 0,290 | 0,248 | 0,235 | 0,219 | | | | 0,000 | 0,011 | -0,031 | -0,044 | -0,060 | | | |
| 25,0 | | 0,297 | 0,327 | 0,265 | 0,247 | 0,230 | | | | 0,000 | 0,030 | -0,032 | -0,050 | -0,067 | | | |
| | | 0,287 | 0,323 | 0,272 | 0,232 | 0,229 | 0,192 | 0,174 | 0,173 | 0,000 | 0,036 | -0,015 | -0,055 | -0,058 | -0,095 | -0,113 | -0,114 |
| | | 0,299 | 0,320 | 0,217 | 0,250 | 0,227 | | | | 0,000 | 0,021 | -0,082 | -0,049 | -0,072 | | | |
| 50,0 | | 0,295 | 0,279 | 0,222 | 0,194 | 0,175 | | | | 0,000 | -0,016 | -0,073 | -0,101 | -0,120 | | | |
| | | 0,276 | 0,266 | 0,254 | 0,167 | 0,185 | 0,134 | 0,156 | 0,123 | 0,000 | -0,010 | -0,022 | -0,109 | -0,091 | -0,142 | -0,120 | -0,153 |
| | | 0,298 | 0,285 | 0,226 | 0,222 | 0,174 | | | | 0,000 | -0,013 | -0,072 | -0,076 | -0,124 | | | |
| 100,0 | | 0,286 | 0,282 | 0,205 | 0,221 | 0,186 | | | | 0,000 | -0,004 | -0,081 | -0,065 | -0,100 | | | |
| | | 0,300 | 0,294 | 0,208 | 0,253 | 0,227 | 0,176 | 0,199 | 0,182 | 0,000 | -0,006 | -0,092 | -0,047 | -0,073 | -0,124 | -0,101 | -0,118 |
| | | 0,301 | 0,305 | 0,211 | 0,256 | 0,205 | | | | 0,000 | 0,004 | -0,090 | -0,045 | -0,096 | | | |

Tabla A VI.3.

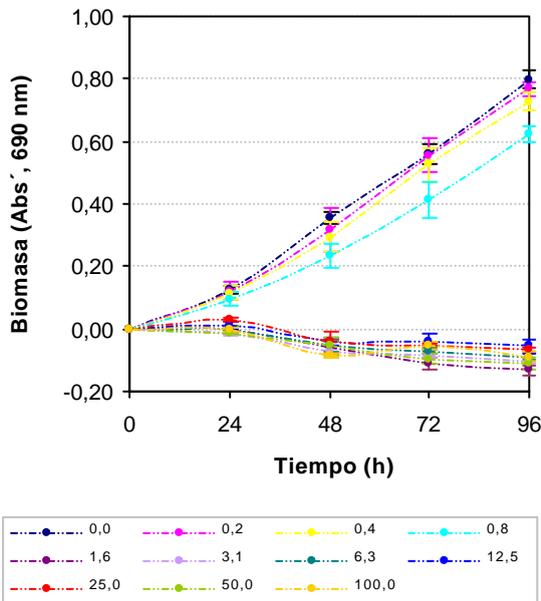
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs´)

| t (h) | mg/L COBRE (II) | | | | | | | | | | | Promedio |
|-----------|-----------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|----------|
| | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,1 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | |
| 24 | 0,125 | 0,120 | 0,115 | 0,097 | -0,004 | -0,012 | -0,002 | 0,011 | 0,029 | -0,013 | -0,002 | DesvEst |
| | 0,015 | 0,028 | 0,021 | 0,023 | 0,010 | 0,006 | 0,010 | 0,014 | 0,008 | 0,003 | 0,005 | |
| 48 | 0,356 | 0,316 | 0,294 | 0,234 | -0,058 | -0,074 | -0,056 | -0,041 | -0,043 | -0,056 | -0,088 | DesvEst |
| | 0,021 | 0,072 | 0,050 | 0,036 | 0,022 | 0,018 | 0,014 | 0,013 | 0,035 | 0,029 | 0,006 | |
| 72 | 0,561 | 0,556 | 0,525 | 0,414 | -0,110 | -0,084 | -0,070 | -0,040 | -0,051 | -0,095 | -0,052 | DesvEst |
| | 0,032 | 0,055 | 0,052 | 0,059 | 0,018 | 0,008 | 0,010 | 0,026 | 0,003 | 0,017 | 0,011 | |
| 96 | 0,798 | 0,768 | 0,727 | 0,625 | -0,131 | -0,106 | -0,089 | -0,056 | -0,066 | -0,112 | -0,090 | DesvEst |
| | 0,027 | 0,024 | 0,029 | 0,026 | 0,015 | 0,003 | 0,009 | 0,022 | 0,007 | 0,018 | 0,015 | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

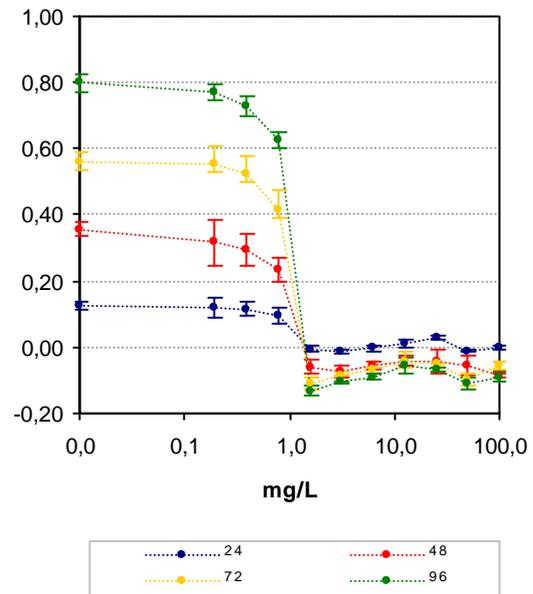


Tabla A VI.4.

Valores de NOEC y LOEC experimentales obtenidos para *N. gaditana* expuesta a diferentes concentraciones de COBRE (II).

| <i>N. gaditana</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,972 | | 0,969 | | 0,955 | | 0,964 | |
| B calculado | 12,72 | | 13,58 | | 15,13 | | 10,68 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L Cu (II) | t _i | p |
| 0,2 | 0,41 | 0,39866 | 1,43 | 0,20473 | 0,19 | 0,44906 | 1,88 | 0,11120 |
| 0,4 | 0,82 | 0,26431 | 2,22 | 0,06022 | 1,31 | 0,18584 | 4,47 (*) | 0,01735 |
| 0,8 | 2,35 | 0,06975 | 4,39 (*) | 0,00377 | 5,43 (*) | 0,00961 | 10,95 | 0,00064 |
| 1,6 | 10,65 (*) | 0,00011 | 14,95 | 0,00001 | 24,88 | 0,00000 | 58,80 | 0,00000 |
| 3,1 | 11,28 | 0,00006 | 15,51 | 0,00001 | 23,92 | 0,00000 | 57,18 | 0,00000 |
| 6,3 | 10,48 | 0,00012 | 14,87 | 0,00000 | 23,41 | 0,00000 | 56,15 | 0,00000 |
| 12,5 | 9,42 | 0,00028 | 14,32 | 0,00001 | 22,30 | 0,00001 | 54,02 | 0,00000 |
| 25,0 | 7,91 | 0,00026 | 14,40 | 0,00004 | 22,95 | 0,00000 | 54,65 | 0,00000 |
| 50,0 | 11,36 | 0,00004 | 14,86 | 0,00002 | 24,34 | 0,00000 | 57,56 | 0,00000 |
| 100,0 | 10,46 | 0,00007 | 16,01 | 0,00000 | 22,74 | 0,00000 | 56,17 | 0,00000 |
| MSD | 0,032 | | 0,073 | | 0,071 | | 0,042 | |
| % reducción | 25,65 | | 20,55 | | 12,69 | | 5,23 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,946 | | 0,948 | | 0,956 | | 0,956 | | 0,959 | | 0,955 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 6,57 | | 9,57 | | 10,01 | | 11,73 | | 12,86 | | 15,13 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L Cu (II) | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,2 | 0,15 | 0,45 | 0,16 | 0,45 | 0,16 | 0,45 | 0,17 | 0,45 | 0,18 | 0,45 | 0,19 | 0,45 |
| 0,4 | 1,03 | 0,19 | 1,11 | 0,19 | 1,15 | 0,19 | 1,21 | 0,19 | 1,26 | 0,19 | 1,31 | 0,19 |
| 0,8 | 4,27(*) | 0,01 | 4,59(*) | 0,01 | 4,76(*) | 0,01 | 5,00(*) | 0,01 | 5,20(*) | 0,01 | 5,43(*) | 0,01 |
| 1,6 | 19,56 | 0,00 | 21,02 | 0,00 | 21,80 | 0,00 | 22,91 | 0,00 | 23,84 | 0,00 | 24,88 | 0,00 |
| 3,1 | 18,80 | 0,00 | 20,20 | 0,00 | 20,96 | 0,00 | 22,02 | 0,00 | 22,92 | 0,00 | 23,92 | 0,00 |
| 6,3 | --- | --- | 19,77 | 0,00 | 20,51 | 0,00 | 21,55 | 0,00 | 22,43 | 0,00 | 23,41 | 0,00 |
| 12,5 | --- | --- | --- | --- | 19,54 | 0,00 | 20,53 | 0,00 | 21,37 | 0,00 | 22,30 | 0,00 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 21,13 | 0,00 | 22,00 | 0,00 | 22,95 | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 23,32 | 0,00 | 24,34 | 0,00 |
| 100,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 22,74 | 0,00 |
| MSD | 0,086 | | 0,081 | | 0,079 | | 0,076 | | 0,073 | | 0,071 | |
| % reducción | 15,29 | | 14,40 | | 14,04 | | 13,47 | | 13,04 | | 12,69 | |
| * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | | | | | |

Tabla A VI.5.
Valores de ICp del ensayo de *N. gaditana* y Cu (II) a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de Cu (II) estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,3438 | -0,1610 | 0,1035 | 0,3045 | 0,4769 | 0,6232 | 0,1082 |
| | 25 | 0,7593 | 0,4462 | 0,6102 | 0,7417 | 0,8702 | 0,9922 | 0,0722 |
| | 50 | 1,0339 | 0,8814 | 0,9613 | 1,0256 | 1,0982 | 1,1689 | 0,0389 |
| | 75 | 1,2985 | 1,2228 | 1,2625 | 1,2945 | 1,3309 | 1,3665 | 0,0190 |
| | 95 | 1,5101 | 1,4939 | 1,5024 | 1,5093 | 1,5167 | 1,5239 | 1,5239 |
| 96 | 5 | 0,2439 | 0,0025 | 0,1290 | 0,2465 | 0,4083 | 0,5890 | 0,0700 |
| | 25 | 0,8142 | 0,7189 | 0,7688 | 0,8137 | 0,8498 | 0,8889 | 0,0210 |
| | 50 | 1,0638 | 1,0078 | 1,0371 | 1,0632 | 1,0856 | 1,1097 | 0,0130 |
| | 75 | 1,3134 | 1,2854 | 1,3001 | 1,3132 | 1,3249 | 1,3375 | 0,0065 |
| | 95 | 1,5131 | 1,5078 | 1,5106 | 1,5130 | 1,5155 | 1,5181 | 0,0013 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; DesvEst.: Desviación estándar

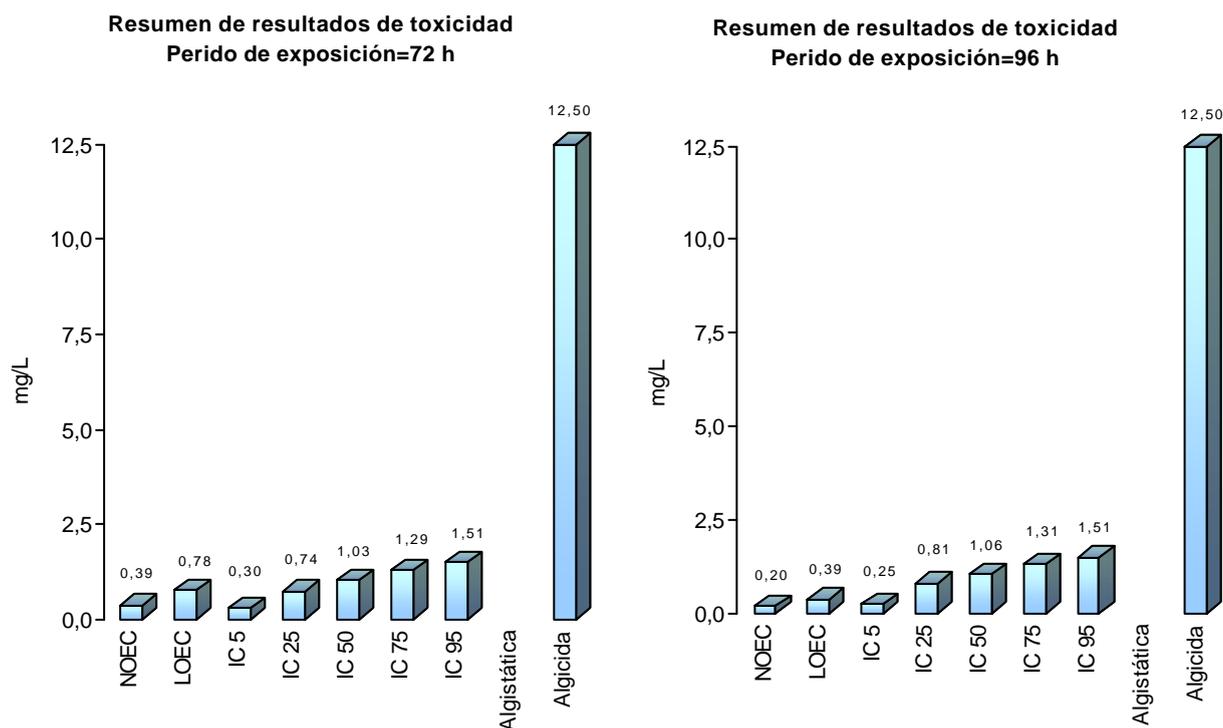
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de Cu (II) ensayadas con *N. gaditana* (100, 50, 25 y 12,5 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo no se observó cambios en la biomasa de los viales inoculados para este estudio. Así pues se define la concentración alguicida a la menor de las concentraciones ensayadas, y en este caso, la concentración alguistática no se ha podido determinar experimentalmente:

- Concentración alguistática= No se ha determinado experimentalmente
- Concentración alguicida= 12,5 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de *cobre* y *N. gaditana*.



2.2. *Isochrysis galbana*

Tabla A VI.6.

Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de COBRE (II).

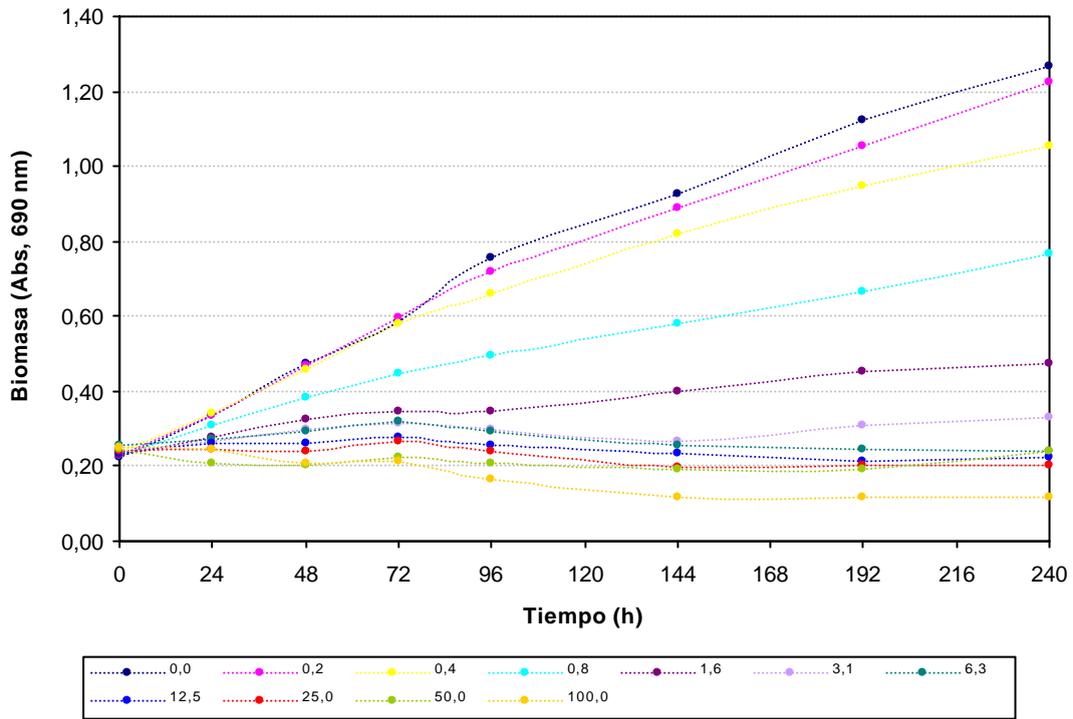
| | | <i>I. galbana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | Abs´ = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | |
|--------------|--|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| t(d) | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| t(h) | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| 0,0 | | 0,220 | 0,341 | 0,477 | 0,586 | 0,750 | | | | 0,000 | 0,121 | 0,257 | 0,366 | 0,530 | | | |
| | | 0,228 | 0,339 | 0,479 | 0,596 | 0,765 | 0,928 | 1,122 | 1,266 | 0,000 | 0,111 | 0,251 | 0,368 | 0,537 | 0,700 | 0,894 | 1,038 |
| | | 0,216 | 0,325 | 0,458 | 0,576 | 0,746 | | | | 0,000 | 0,109 | 0,242 | 0,360 | 0,530 | | | |
| 0,2 | | 0,218 | 0,337 | 0,452 | 0,569 | 0,689 | | | | 0,000 | 0,119 | 0,234 | 0,351 | 0,471 | | | |
| | | 0,241 | 0,350 | 0,484 | 0,614 | 0,734 | 0,888 | 1,055 | 1,226 | 0,000 | 0,109 | 0,243 | 0,373 | 0,493 | 0,647 | 0,814 | 0,985 |
| | | 0,229 | 0,322 | 0,472 | 0,604 | 0,728 | | | | 0,000 | 0,093 | 0,243 | 0,375 | 0,499 | | | |
| 0,4 | | 0,233 | 0,347 | 0,448 | 0,580 | 0,666 | | | | 0,000 | 0,114 | 0,215 | 0,347 | 0,433 | | | |
| | | 0,243 | 0,344 | 0,471 | 0,594 | 0,669 | 0,818 | 0,949 | 1,056 | 0,000 | 0,101 | 0,228 | 0,351 | 0,426 | 0,575 | 0,706 | 0,813 |
| | | 0,235 | 0,336 | 0,459 | 0,574 | 0,646 | | | | 0,000 | 0,101 | 0,224 | 0,339 | 0,411 | | | |
| 0,8 | | 0,264 | 0,329 | 0,386 | 0,480 | 0,501 | | | | 0,000 | 0,065 | 0,122 | 0,216 | 0,237 | | | |
| | | 0,219 | 0,300 | 0,375 | 0,425 | 0,497 | 0,578 | 0,667 | 0,767 | 0,000 | 0,081 | 0,156 | 0,206 | 0,278 | 0,359 | 0,448 | 0,548 |
| | | 0,207 | 0,305 | 0,385 | 0,437 | 0,487 | | | | 0,000 | 0,098 | 0,178 | 0,230 | 0,280 | | | |
| 1,6 | | 0,235 | 0,291 | 0,335 | 0,354 | 0,355 | | | | 0,000 | 0,056 | 0,100 | 0,119 | 0,120 | | | |
| | | 0,242 | 0,283 | 0,324 | 0,356 | 0,354 | 0,399 | 0,452 | 0,476 | 0,000 | 0,041 | 0,082 | 0,114 | 0,112 | 0,157 | 0,210 | 0,234 |
| | | 0,214 | 0,260 | 0,308 | 0,327 | 0,335 | | | | 0,000 | 0,046 | 0,094 | 0,113 | 0,121 | | | |
| 3,1 | | 0,236 | 0,281 | 0,309 | 0,318 | 0,301 | | | | 0,000 | 0,045 | 0,073 | 0,082 | 0,065 | | | |
| | | 0,232 | 0,255 | 0,286 | 0,304 | 0,288 | 0,267 | 0,309 | 0,328 | 0,000 | 0,023 | 0,054 | 0,072 | 0,056 | 0,035 | 0,077 | 0,096 |
| | | 0,251 | 0,270 | 0,302 | 0,316 | 0,305 | | | | 0,000 | 0,019 | 0,051 | 0,065 | 0,054 | | | |
| 6,3 | | 0,260 | 0,280 | 0,294 | 0,310 | 0,300 | | | | 0,000 | 0,020 | 0,034 | 0,050 | 0,040 | | | |
| | | 0,238 | 0,256 | 0,289 | 0,313 | 0,277 | 0,258 | 0,245 | 0,242 | 0,000 | 0,018 | 0,051 | 0,075 | 0,039 | 0,020 | 0,007 | 0,004 |
| | | 0,269 | 0,280 | 0,298 | 0,329 | 0,299 | | | | 0,000 | 0,011 | 0,029 | 0,060 | 0,030 | | | |
| 12,5 | | 0,240 | 0,270 | 0,272 | 0,281 | 0,265 | | | | 0,000 | 0,030 | 0,032 | 0,041 | 0,025 | | | |
| | | 0,228 | 0,258 | 0,262 | 0,280 | 0,265 | 0,232 | 0,213 | 0,225 | 0,000 | 0,030 | 0,034 | 0,052 | 0,037 | 0,004 | -0,015 | -0,003 |
| | | 0,231 | 0,248 | 0,242 | 0,269 | 0,232 | | | | 0,000 | 0,017 | 0,011 | 0,038 | 0,001 | | | |
| 25,0 | | 0,235 | 0,261 | 0,231 | 0,256 | 0,249 | | | | 0,000 | 0,026 | -0,004 | 0,021 | 0,014 | | | |
| | | 0,240 | 0,250 | 0,246 | 0,278 | 0,251 | 0,198 | 0,202 | 0,201 | 0,000 | 0,010 | 0,006 | 0,038 | 0,011 | -0,042 | -0,038 | -0,039 |
| | | 0,245 | 0,227 | 0,242 | 0,261 | 0,218 | | | | 0,000 | -0,018 | -0,003 | 0,016 | -0,027 | | | |
| 50,0 | | 0,242 | 0,227 | 0,228 | 0,248 | 0,233 | | | | 0,000 | -0,015 | -0,014 | 0,006 | -0,009 | | | |
| | | 0,244 | 0,208 | 0,192 | 0,204 | 0,197 | 0,192 | 0,194 | 0,242 | 0,000 | -0,036 | -0,052 | -0,040 | -0,047 | -0,052 | -0,050 | -0,002 |
| | | 0,244 | 0,183 | 0,186 | 0,219 | 0,185 | | | | 0,000 | -0,061 | -0,058 | -0,025 | -0,059 | | | |
| 100,0 | | 0,249 | 0,211 | 0,174 | 0,170 | 0,153 | | | | 0,000 | -0,038 | -0,075 | -0,079 | -0,096 | | | |
| | | 0,250 | 0,248 | 0,222 | 0,231 | 0,167 | 0,115 | 0,119 | 0,117 | 0,000 | -0,002 | -0,028 | -0,019 | -0,083 | -0,135 | -0,131 | -0,133 |
| | | 0,251 | 0,270 | 0,233 | 0,241 | 0,180 | | | | 0,000 | 0,019 | -0,018 | -0,010 | -0,071 | | | |

Tabla A VI.7.

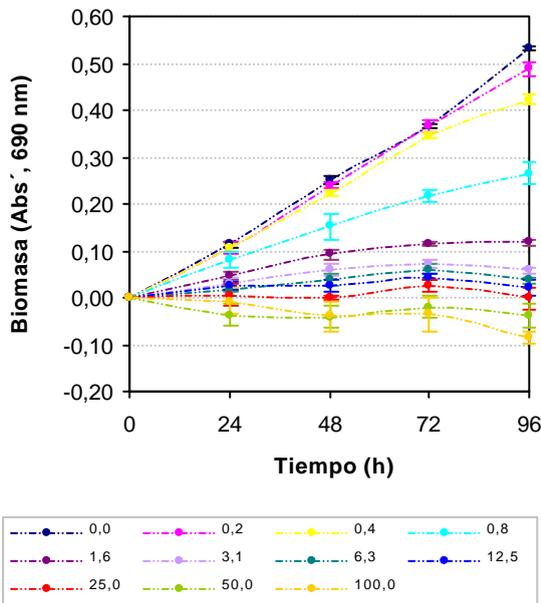
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs´)

| t (h) | mg/L COBRE (II) | | | | | | | | | | | Promedio |
|-----------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|----------|
| | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,1 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | |
| 24 | 0,114 | 0,107 | 0,105 | 0,081 | 0,048 | 0,029 | 0,016 | 0,026 | 0,006 | -0,037 | -0,007 | DesvEst |
| | 0,006 | 0,013 | 0,008 | 0,017 | 0,008 | 0,014 | 0,005 | 0,008 | 0,022 | 0,023 | 0,029 | |
| 48 | 0,250 | 0,240 | 0,222 | 0,152 | 0,092 | 0,059 | 0,038 | 0,026 | 0,000 | -0,041 | -0,040 | DesvEst |
| | 0,008 | 0,005 | 0,007 | 0,028 | 0,009 | 0,012 | 0,012 | 0,013 | 0,006 | 0,024 | 0,030 | |
| 72 | 0,365 | 0,366 | 0,346 | 0,217 | 0,115 | 0,073 | 0,062 | 0,044 | 0,025 | -0,020 | -0,036 | DesvEst |
| | 0,004 | 0,013 | 0,006 | 0,012 | 0,003 | 0,009 | 0,013 | 0,007 | 0,012 | 0,023 | 0,038 | |
| 96 | 0,532 | 0,488 | 0,423 | 0,265 | 0,118 | 0,058 | 0,036 | 0,021 | -0,001 | -0,038 | -0,083 | DesvEst |
| | 0,004 | 0,015 | 0,011 | 0,024 | 0,005 | 0,006 | 0,006 | 0,018 | 0,023 | 0,026 | 0,013 | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

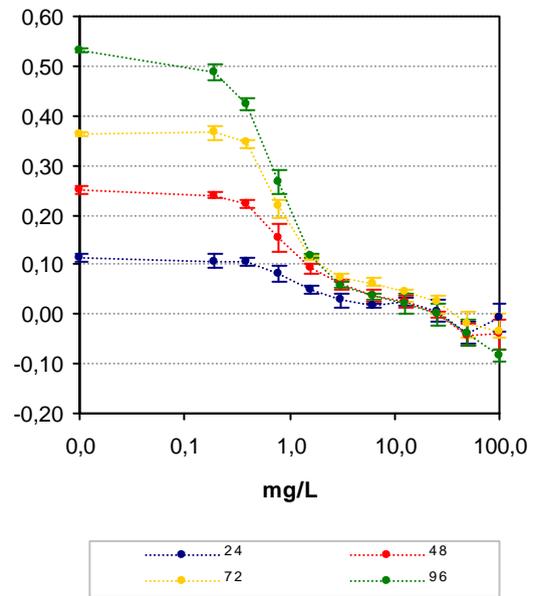


Tabla A VI.8.

Valores de NOEC y LOEC experimentales obtenidos para *L. galbana* expuesta a diferentes concentraciones de COBRE (II).

| <i>L. galbana</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,979 | | 0,968 | | 0,948 | | 0,970 | |
| B calculado | 10,95 | | 13,24 | | 16,97 | | 12,67 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L Cu (II) | t _i | p |
| 0,2 | 0,52 | 0,23671 | 0,75 | 0,06589 | -0,13 | 0,42310 | 3,47 (*) | 0,00359 |
| 0,4 | 0,65 | 0,10897 | 2,06 | 0,00445 | 1,47 | 0,00562 | 8,47 | 0,00005 |
| 0,8 | 2,51 | 0,01706 | 7,30 (*) | 0,00218 | 11,38 (*) | 0,00002 | 20,77 | 0,00002 |
| 1,6 | 5,13 (*) | 0,00017 | 11,77 | 0,00001 | 19,27 | 0,00000 | 32,21 | 0,00000 |
| 3,1 | 6,58 | 0,00034 | 14,21 | 0,00001 | 22,54 | 0,00000 | 36,82 | 0,00000 |
| 6,3 | 7,56 | 0,00001 | 15,80 | 0,00001 | 23,41 | 0,00000 | 38,53 | 0,00000 |
| 12,5 | 6,84 | 0,00005 | 16,72 | 0,00001 | 24,80 | 0,00000 | 39,72 | 0,00000 |
| 25,0 | 8,37 | 0,00065 | 18,65 | 0,00000 | 26,25 | 0,00000 | 41,41 | 0,00000 |
| 50,0 | 11,73 | 0,00020 | 21,71 | 0,00002 | 29,70 | 0,00000 | 44,33 | 0,00000 |
| 100,0 | 9,38 | 0,00105 | 21,63 | 0,00004 | 30,96 | 0,00003 | 47,83 | 0,00000 |
| MSD | 0,034 | | 0,035 | | 0,034 | | 0,034 | |
| % reducción | 29,89 | | 14,17 | | 9,37 | | 6,38 | |
| <p><i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64</p> <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| <i>t=72 h</i> | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,985 | | 0,979 | | 0,980 | | 0,972 | | 0,985 | | 0,948 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 4,69 | | 5,13 | | 5,30 | | 5,50 | | 9,45 | | 16,97 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L Cu (II) | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,2 | -0,23 | 0,42 | -0,22 | 0,42 | -0,22 | 0,42 | -0,22 | 0,42 | -0,18 | 0,42 | -0,13 | 0,42 |
| 0,4 | 2,66(*) | 0,01 | 2,47 | 0,01 | 2,54 | 0,01 | 2,46 | 0,01 | 2,00 | 0,01 | 1,47 | 0,01 |
| 0,8 | 20,59 | 0,00 | 19,19(*) | 0,00 | 19,67(*) | 0,00 | 19,06(*) | 0,00 | 15,49(*) | 0,00 | 11,38(*) | 0,00 |
| 1,6 | 34,85 | 0,00 | 32,47 | 0,00 | 33,29 | 0,00 | 32,26 | 0,00 | 26,22 | 0,00 | 19,27 | 0,00 |
| 3,1 | 40,77 | 0,00 | 37,99 | 0,00 | 38,94 | 0,00 | 37,74 | 0,00 | 30,67 | 0,00 | 22,54 | 0,00 |
| 6,3 | --- | --- | 39,46 | 0,00 | 40,45 | 0,00 | 39,21 | 0,00 | 31,86 | 0,00 | 23,41 | 0,00 |
| 12,5 | --- | --- | --- | --- | 42,85 | 0,00 | 41,54 | 0,00 | 33,75 | 0,00 | 24,80 | 0,00 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 43,95 | 0,00 | 35,72 | 0,00 | 26,25 | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 40,41 | 0,00 | 29,70 | 0,00 |
| 100,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 30,96 | 0,00 |
| MSD | 0,018 | | 0,019 | | 0,019 | | 0,020 | | 0,025 | | 0,034 | |
| % reducción | 4,90 | | 5,33 | | 5,26 | | 5,47 | | 6,78 | | 9,37 | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | | | | | |

Tabla A VI.9.
Valores de ICp del ensayo de *I. galbana* y Cu (II) a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de Cu (II) estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,3756 | 0,2478 | 0,3147 | 0,3643 | 0,4042 | 0,4357 | 0,0274 |
| | 25 | 0,6084 | 0,5583 | 0,5845 | 0,6061 | 0,6313 | 0,6564 | 0,0122 |
| | 50 | 1,0461 | 0,9099 | 0,9813 | 1,0403 | 1,0986 | 1,1563 | 0,0305 |
| | 75 | 2,4470 | 2,1329 | 2,2974 | 2,4489 | 2,6720 | 2,9195 | 0,0932 |
| | 95 | 31,7250 | 15,5526 | 24,0238 | 31,0158 | 37,8947 | 44,6814 | 44,6814 |
| 96 | 5 | 0,1162 | 0,0499 | 0,0846 | 0,1188 | 0,1566 | 0,2010 | 0,0193 |
| | 25 | 0,4503 | 0,3947 | 0,4238 | 0,4498 | 0,4731 | 0,4981 | 0,0129 |
| | 50 | 0,7781 | 0,6578 | 0,7208 | 0,7895 | 0,8505 | 0,9301 | 0,0396 |
| | 75 | 1,4812 | 1,4277 | 1,4557 | 1,4813 | 1,5029 | 1,5268 | 0,0127 |
| | 95 | 10,2106 | 5,4121 | 7,9256 | 11,0694 | 16,3690 | 23,1433 | 2,4924 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

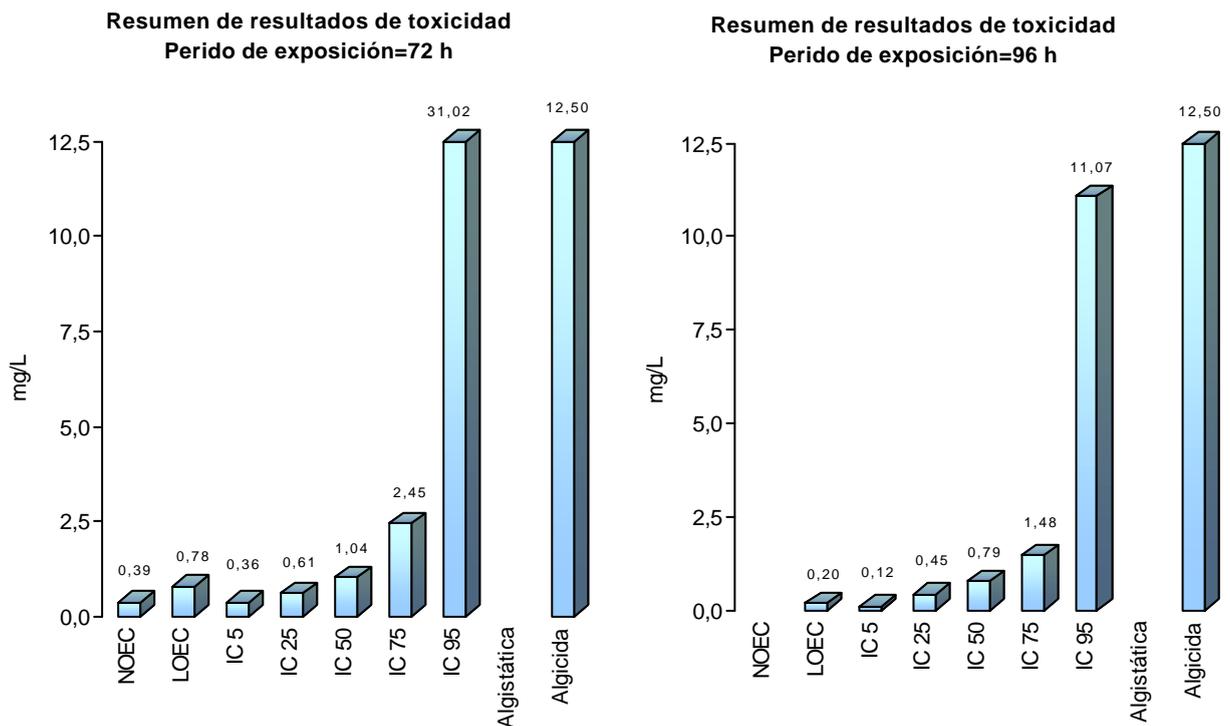
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de Cu (II) ensayadas con *I. galbana* (100, 50, 25 y 12,5 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo no se observó cambios en la biomasa de los viales inoculados para este estudio. Así pues se define la concentración alguicida a la menor de las concentraciones ensayadas, y en este caso, la concentración alguistática no se ha podido determinar experimentalmente:

- Concentración alguistática= No se ha determinado experimentalmente
- Concentración alguicida= 12,5 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de *cobre* y *I. galbana*.



2.3. *Dunaliella salina*

Tabla A VI.10.

Evolución de la biomasa de *Dunaliella salina*. Ensayo de COBRE (II).

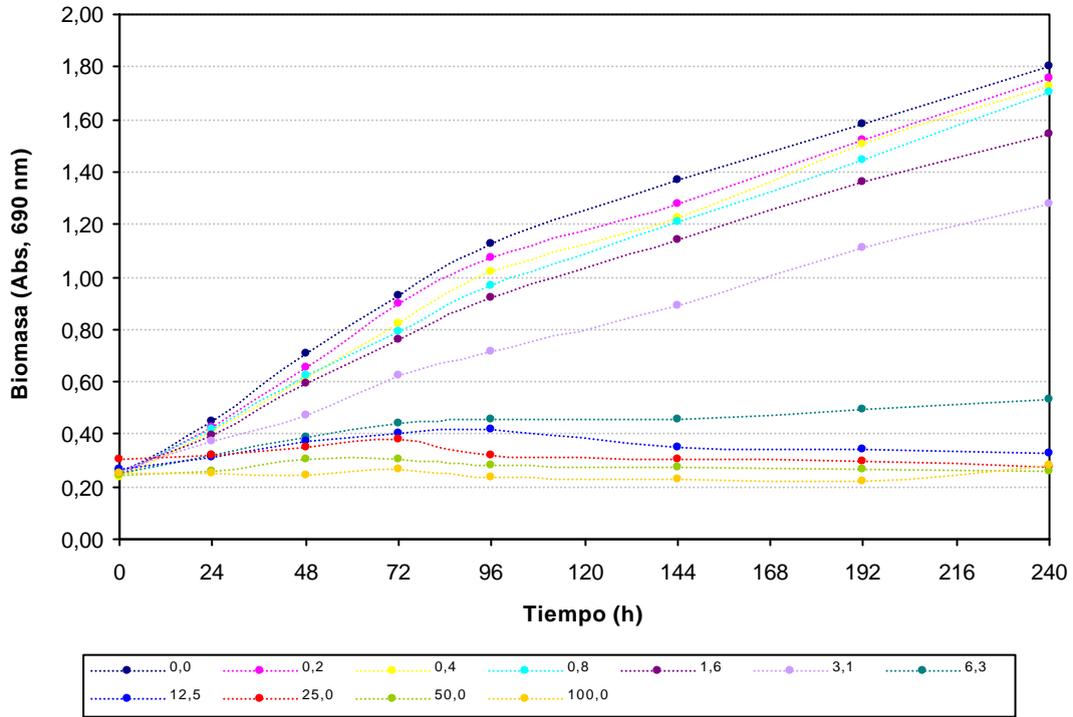
| t(d) | <i>D. salina</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | Abs´ = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | | |
|--------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|------------------------|--------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| 0,0 | 0,267 | 0,479 | 0,765 | 1,002 | 1,201 | | | | | 0,000 | 0,212 | 0,498 | 0,735 | 0,934 | | | | |
| | 0,259 | 0,460 | 0,725 | 0,957 | 1,156 | 1,366 | 1,582 | 1,800 | | 0,000 | 0,201 | 0,466 | 0,698 | 0,897 | 1,107 | 1,323 | 1,541 | |
| | 0,234 | 0,414 | 0,638 | 0,818 | 1,023 | | | | | 0,000 | 0,180 | 0,404 | 0,584 | 0,789 | | | | |
| 0,2 | 0,253 | 0,458 | 0,727 | 0,958 | 1,175 | | | | | 0,000 | 0,205 | 0,474 | 0,705 | 0,922 | | | | |
| | 0,233 | 0,413 | 0,622 | 0,878 | 1,053 | 1,278 | 1,523 | 1,756 | | 0,000 | 0,180 | 0,389 | 0,645 | 0,820 | 1,045 | 1,290 | 1,523 | |
| | 0,238 | 0,397 | 0,620 | 0,846 | 0,999 | | | | | 0,000 | 0,159 | 0,382 | 0,608 | 0,761 | | | | |
| 0,4 | 0,235 | 0,443 | 0,671 | 0,900 | 1,111 | | | | | 0,000 | 0,208 | 0,436 | 0,665 | 0,876 | | | | |
| | 0,251 | 0,426 | 0,636 | 0,837 | 1,040 | 1,223 | 1,502 | 1,728 | | 0,000 | 0,175 | 0,385 | 0,586 | 0,789 | 0,972 | 1,251 | 1,477 | |
| | 0,224 | 0,368 | 0,537 | 0,727 | 0,902 | | | | | 0,000 | 0,144 | 0,313 | 0,503 | 0,678 | | | | |
| 0,8 | 0,270 | 0,450 | 0,694 | 0,894 | 1,035 | | | | | 0,000 | 0,180 | 0,424 | 0,624 | 0,765 | | | | |
| | 0,262 | 0,437 | 0,666 | 0,801 | 1,003 | 1,207 | 1,445 | 1,700 | | 0,000 | 0,175 | 0,404 | 0,539 | 0,741 | 0,945 | 1,183 | 1,438 | |
| | 0,232 | 0,372 | 0,517 | 0,685 | 0,856 | | | | | 0,000 | 0,140 | 0,285 | 0,453 | 0,624 | | | | |
| 1,6 | 0,265 | 0,412 | 0,669 | 0,838 | 1,057 | | | | | 0,000 | 0,147 | 0,404 | 0,573 | 0,792 | | | | |
| | 0,251 | 0,395 | 0,584 | 0,765 | 0,900 | 1,144 | 1,361 | 1,545 | | 0,000 | 0,144 | 0,333 | 0,514 | 0,649 | 0,893 | 1,110 | 1,294 | |
| | 0,263 | 0,377 | 0,534 | 0,669 | 0,793 | | | | | 0,000 | 0,114 | 0,271 | 0,406 | 0,530 | | | | |
| 3,1 | 0,262 | 0,355 | 0,490 | 0,672 | 0,723 | | | | | 0,000 | 0,093 | 0,228 | 0,410 | 0,461 | | | | |
| | 0,257 | 0,420 | 0,464 | 0,636 | 0,755 | 0,886 | 1,111 | 1,278 | | 0,000 | 0,163 | 0,207 | 0,379 | 0,498 | 0,629 | 0,854 | 1,021 | |
| | 0,251 | 0,334 | 0,455 | 0,564 | 0,664 | | | | | 0,000 | 0,083 | 0,204 | 0,313 | 0,413 | | | | |
| 6,3 | 0,247 | 0,338 | 0,407 | 0,460 | 0,492 | | | | | 0,000 | 0,091 | 0,160 | 0,213 | 0,245 | | | | |
| | 0,252 | 0,303 | 0,369 | 0,410 | 0,425 | 0,458 | 0,494 | 0,530 | | 0,000 | 0,051 | 0,117 | 0,158 | 0,173 | 0,206 | 0,242 | 0,278 | |
| | 0,252 | 0,314 | 0,394 | 0,447 | 0,456 | | | | | 0,000 | 0,062 | 0,142 | 0,195 | 0,204 | | | | |
| 12,5 | 0,255 | 0,303 | 0,377 | 0,406 | 0,422 | | | | | 0,000 | 0,048 | 0,122 | 0,151 | 0,167 | | | | |
| | 0,279 | 0,321 | 0,383 | 0,420 | 0,395 | 0,350 | 0,345 | 0,325 | | 0,000 | 0,042 | 0,104 | 0,141 | 0,116 | 0,071 | 0,066 | 0,046 | |
| | 0,264 | 0,310 | 0,358 | 0,394 | 0,427 | | | | | 0,000 | 0,046 | 0,094 | 0,130 | 0,163 | | | | |
| 25,0 | 0,319 | 0,335 | 0,355 | 0,397 | 0,378 | | | | | 0,000 | 0,016 | 0,036 | 0,078 | 0,059 | | | | |
| | 0,292 | 0,314 | 0,345 | 0,357 | 0,256 | 0,301 | 0,298 | 0,275 | | 0,000 | 0,022 | 0,053 | 0,065 | -0,036 | 0,009 | 0,006 | -0,017 | |
| | 0,291 | 0,315 | 0,360 | 0,385 | 0,316 | | | | | 0,000 | 0,024 | 0,069 | 0,094 | 0,025 | | | | |
| 50,0 | 0,242 | 0,250 | 0,312 | 0,301 | 0,290 | | | | | 0,000 | 0,008 | 0,070 | 0,059 | 0,048 | | | | |
| | 0,244 | 0,255 | 0,301 | 0,314 | 0,284 | 0,270 | 0,263 | 0,260 | | 0,000 | 0,011 | 0,057 | 0,070 | 0,040 | 0,026 | 0,019 | 0,016 | |
| | 0,244 | 0,260 | 0,294 | 0,289 | 0,279 | | | | | 0,000 | 0,016 | 0,050 | 0,045 | 0,035 | | | | |
| 100,0 | 0,249 | 0,245 | 0,262 | 0,271 | 0,248 | | | | | 0,000 | -0,004 | 0,013 | 0,022 | -0,001 | | | | |
| | 0,250 | 0,268 | 0,228 | 0,280 | 0,236 | 0,227 | 0,223 | 0,280 | | 0,000 | 0,018 | -0,022 | 0,030 | -0,014 | -0,023 | -0,027 | 0,030 | |
| | 0,251 | 0,247 | 0,238 | 0,254 | 0,229 | | | | | 0,000 | -0,004 | -0,013 | 0,003 | -0,022 | | | | |

Tabla A VI.11.

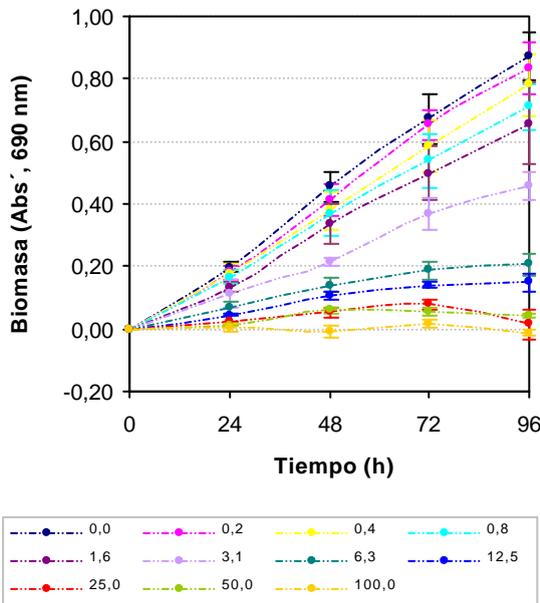
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs´)

| t (h) | mg/L COBRE (II) | | | | | | | | | | | Promedio DesvEst |
|-----------|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------------|
| | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,1 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | |
| 24 | 0,198 | 0,181 | 0,176 | 0,165 | 0,135 | 0,113 | 0,068 | 0,045 | 0,021 | 0,012 | 0,003 | DesvEst |
| | 0,016 | 0,023 | 0,032 | 0,022 | 0,018 | 0,044 | 0,021 | 0,003 | 0,004 | 0,004 | 0,013 | |
| 48 | 0,456 | 0,415 | 0,378 | 0,371 | 0,336 | 0,213 | 0,140 | 0,107 | 0,053 | 0,059 | -0,007 | DesvEst |
| | 0,048 | 0,051 | 0,062 | 0,075 | 0,067 | 0,013 | 0,022 | 0,014 | 0,017 | 0,010 | 0,018 | |
| 72 | 0,672 | 0,653 | 0,585 | 0,539 | 0,498 | 0,367 | 0,189 | 0,141 | 0,079 | 0,058 | 0,018 | DesvEst |
| | 0,079 | 0,049 | 0,081 | 0,086 | 0,085 | 0,050 | 0,028 | 0,011 | 0,015 | 0,013 | 0,014 | |
| 96 | 0,873 | 0,834 | 0,781 | 0,710 | 0,657 | 0,457 | 0,207 | 0,149 | 0,016 | 0,041 | -0,012 | DesvEst |
| | 0,075 | 0,081 | 0,099 | 0,075 | 0,131 | 0,043 | 0,036 | 0,028 | 0,048 | 0,007 | 0,011 | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

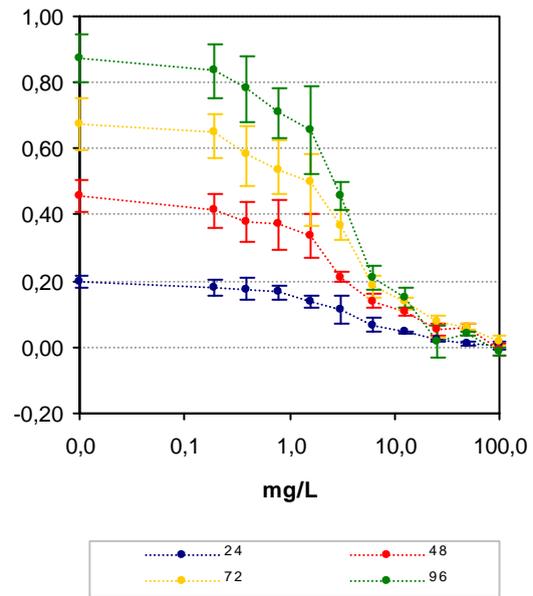


Tabla A VI.12.

Valores de NOEC y LOEC experimentales obtenidos para *D. salina* expuesta a diferentes concentraciones de COBRE (II).

| <i>D. salina</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,969 | | 0,965 | | 0,937 | | 0,978 | |
| B calculado | 17,48 | | 15,62 | | 17,48 | | 17,46 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L Cu (II) | t _i | p |
| 0,2 | 0,92 | 0,18619 | 1,17 | 0,18402 | 0,42 | 0,36593 | 0,70 | 0,28776 |
| 0,4 | 1,24 | 0,17415 | 2,22 | 0,07940 | 1,86 | 0,12500 | 1,65 | 0,13431 |
| 0,8 | 1,85 | 0,05296 | 2,42 | 0,08682 | 2,83 (*) | 0,05858 | 2,92 (*) | 0,02839 |
| 1,6 | 3,54 (*) | 0,00566 | 3,42 (*) | 0,03210 | 3,70 | 0,02950 | 3,87 | 0,03422 |
| 3,1 | 4,79 | 0,01722 | 6,92 | 0,00053 | 6,46 | 0,00237 | 7,45 | 0,00057 |
| 6,3 | 7,33 | 0,00052 | 9,01 | 0,00024 | 10,24 | 0,00028 | 11,93 | 0,00008 |
| 12,5 | 8,62 | 0,00005 | 9,95 | 0,00013 | 11,26 | 0,00016 | 12,98 | 0,00005 |
| 25,0 | 10,01 | 0,00003 | 11,49 | 0,00008 | 12,57 | 0,00011 | 15,35 | 0,00004 |
| 50,0 | 10,52 | 0,00002 | 11,31 | 0,00007 | 13,01 | 0,00009 | 14,90 | 0,00002 |
| 100,0 | 10,99 | 0,00004 | 13,19 | 0,00005 | 13,85 | 0,00007 | 15,86 | 0,00002 |
| MSD | 0,047 | | 0,093 | | 0,125 | | 0,147 | |
| % reducción | 23,61 | | 20,33 | | 18,54 | | 16,88 | |
| <p><i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1. y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|--|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | | |
| W calculado | 0,919 | | 0,940 | | 0,945 | | 0,946 | | 0,942 | | 0,937 | | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | | |
| B calculado | 1,05 | | 2,74 | | 7,31 | | 10,68 | | 14,32 | | 17,48 | | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | | |
| mg/L Cu (II) | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | | |
| 0,2 | 0,33 | 0,37 | 0,35 | 0,37 | 0,38 | 0,37 | 0,40 | 0,37 | 0,42 | 0,37 | 0,42 | 0,37 | |
| 0,4 | 1,47 | 0,13 | 1,57 | 0,13 | 1,67 | 0,13 | 1,77 | 0,13 | 1,86 | 0,13 | 1,86 | 0,13 | |
| 0,8 | 2,24 | 0,06 | 2,39 | 0,06 | 2,55 | 0,06 | 2,70(*) | 0,06 | 2,83(*) | 0,06 | 2,83(*) | 0,06 | |
| 1,6 | 2,93(*) | 0,03 | 3,12(*) | 0,03 | 3,33(*) | 0,03 | 3,52 | 0,03 | 3,70 | 0,03 | 3,70 | 0,03 | |
| 3,1 | 5,11 | 0,00 | 5,45 | 0,00 | 5,82 | 0,00 | 6,15 | 0,00 | 6,47 | 0,00 | 6,46 | 0,00 | |
| 6,3 | --- | --- | 8,64 | 0,00 | 9,23 | 0,00 | 9,75 | 0,00 | 10,26 | 0,00 | 10,24 | 0,00 | |
| 12,5 | --- | --- | --- | --- | 10,14 | 0,00 | 10,72 | 0,00 | 11,27 | 0,00 | 11,26 | 0,00 | |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 11,96 | 0,00 | 12,58 | 0,00 | 12,57 | 0,00 | |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 13,03 | 0,00 | 13,01 | 0,00 | |
| 100,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 13,85 | 0,00 | |
| MSD | 0,149 | | 0,142 | | 0,134 | | 0,128 | | 0,123 | | 0,125 | | |
| % reducción | 22,20 | | 21,06 | | 19,96 | | 19,03 | | 18,24 | | 18,54 | | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | | | | | | |

Tabla A VI.13.
Valores de ICp del ensayo de *D. salina* y Cu (II) a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de Cu (II) estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,2352 | -0,0999 | 0,0756 | 0,2358 | 0,5238 | 0,8412 | 0,1231 |
| | 25 | 1,4374 | -0,7661 | 0,3881 | 1,3368 | 2,1778 | 2,9921 | 0,5038 |
| | 50 | 3,6701 | 1,9824 | 2,8665 | 3,6017 | 4,3847 | 5,1707 | 0,4191 |
| | 75 | 8,9301 | 2,9693 | 6,0917 | 8,6540 | 11,0550 | 13,3923 | 1,4161 |
| | 95 | 80,7353 | 53,9470 | 67,9790 | 80,7873 | 93,9831 | 108,5556 | 108,5556 |
| 96 | 5 | 0,2122 | -0,0887 | 0,0689 | 0,2308 | 0,5219 | 0,8626 | 0,1286 |
| | 25 | 1,5786 | -0,3005 | 0,6838 | 1,4792 | 2,1636 | 2,8071 | 0,4323 |
| | 50 | 3,3833 | 2,2941 | 2,8647 | 3,3638 | 3,8707 | 4,4068 | 0,2759 |
| | 75 | 6,1125 | 5,2184 | 5,6867 | 6,3252 | 8,1397 | 10,3696 | 0,6357 |
| | 95 | 23,4223 | 19,3526 | 21,4844 | 26,4212 | 51,2945 | 81,9538 | 7,8225 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

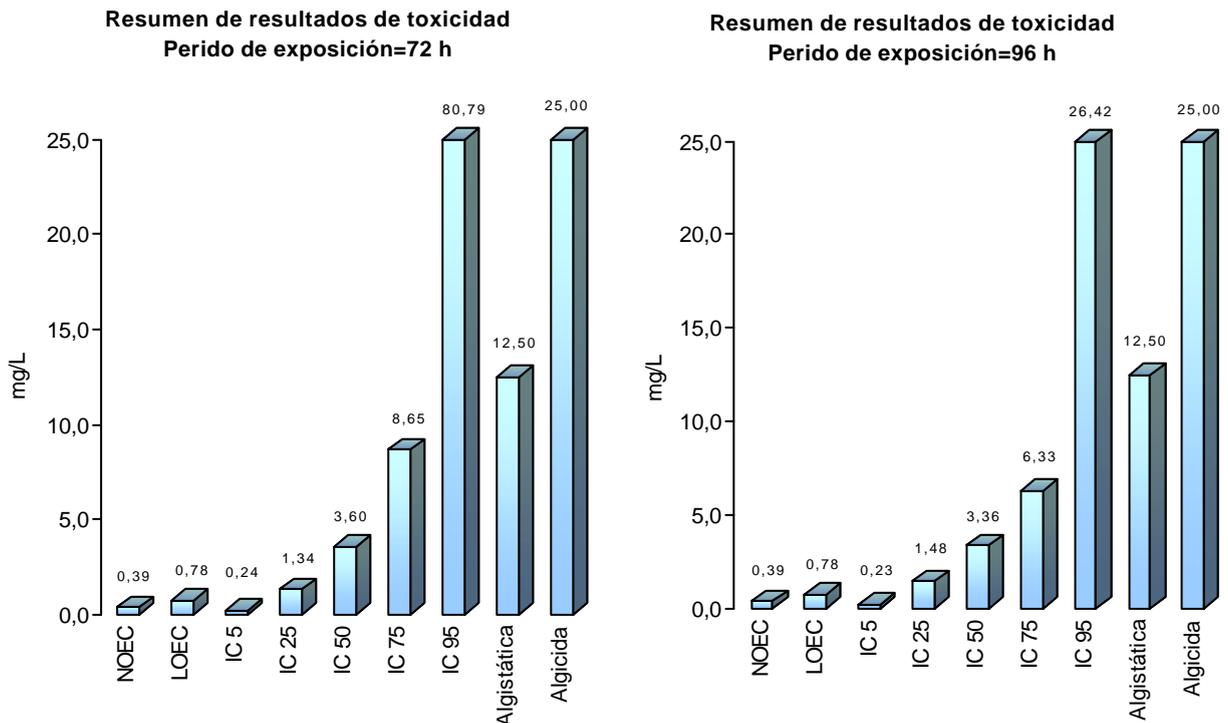
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de Cu (II) ensayadas con *D. salina* (100, 50, 25 y 12,5 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo no se observó cambios en los tres viales correspondientes a las mayores concentraciones ensayadas. En el vial de 12,5 mg/L de Cu (II) se observó un aumento en la biomasa del cultivo.

- Concentración alguistática= 12,5 mg/L
- Concentración alguicida= 25 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de *cobre* y *D. salina*.



2.4. *Chaetoceros gracilis*

Tabla A VI.14.

Evolución de la biomasa de *Chaetoceros gracilis*. Ensayo de COBRE (II).

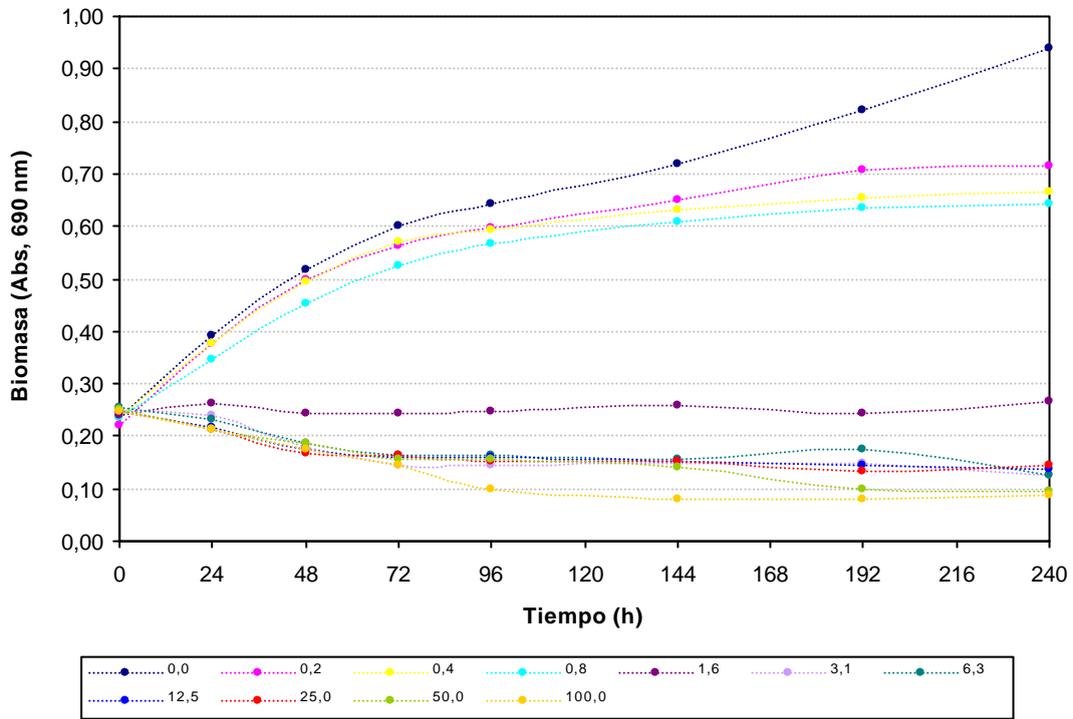
| <i>C. gracilis</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | $Abs' = Abs t - Abs t=0$ | | | | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| 0,0 | 0,242 | 0,403 | 0,516 | 0,583 | 0,650 | | | | 0,000 | 0,161 | 0,274 | 0,341 | 0,408 | | | | |
| | 0,245 | 0,395 | 0,518 | 0,607 | 0,635 | 0,718 | 0,823 | 0,938 | 0,000 | 0,150 | 0,273 | 0,362 | 0,390 | 0,473 | 0,578 | 0,693 | |
| | 0,219 | 0,380 | 0,523 | 0,609 | 0,640 | | | | 0,000 | 0,161 | 0,304 | 0,390 | 0,421 | | | | |
| 0,2 | 0,216 | 0,386 | 0,500 | 0,586 | 0,603 | | | | 0,000 | 0,170 | 0,284 | 0,370 | 0,387 | | | | |
| | 0,226 | 0,369 | 0,498 | 0,555 | 0,602 | 0,651 | 0,706 | 0,715 | 0,000 | 0,143 | 0,272 | 0,329 | 0,376 | 0,425 | 0,480 | 0,489 | |
| | 0,218 | 0,370 | 0,495 | 0,549 | 0,588 | | | | 0,000 | 0,152 | 0,277 | 0,331 | 0,370 | | | | |
| 0,4 | 0,244 | 0,383 | 0,503 | 0,576 | 0,608 | | | | 0,000 | 0,139 | 0,259 | 0,332 | 0,364 | | | | |
| | 0,224 | 0,372 | 0,475 | 0,570 | 0,578 | 0,630 | 0,653 | 0,667 | 0,000 | 0,148 | 0,251 | 0,346 | 0,354 | 0,406 | 0,429 | 0,443 | |
| | 0,244 | 0,374 | 0,502 | 0,564 | 0,588 | | | | 0,000 | 0,130 | 0,258 | 0,320 | 0,344 | | | | |
| 0,8 | 0,229 | 0,335 | 0,478 | 0,548 | 0,585 | | | | 0,000 | 0,106 | 0,249 | 0,319 | 0,356 | | | | |
| | 0,244 | 0,359 | 0,434 | 0,491 | 0,541 | 0,610 | 0,636 | 0,642 | 0,000 | 0,115 | 0,190 | 0,247 | 0,297 | 0,366 | 0,392 | 0,398 | |
| | 0,239 | 0,346 | 0,446 | 0,533 | 0,569 | | | | 0,000 | 0,107 | 0,207 | 0,294 | 0,330 | | | | |
| 1,6 | 0,242 | 0,265 | 0,251 | 0,253 | 0,258 | | | | 0,000 | 0,023 | 0,009 | 0,011 | 0,016 | | | | |
| | 0,247 | 0,258 | 0,240 | 0,240 | 0,239 | 0,258 | 0,242 | 0,266 | 0,000 | 0,011 | -0,007 | -0,007 | -0,008 | 0,011 | -0,005 | 0,019 | |
| | 0,229 | 0,261 | 0,244 | 0,241 | 0,242 | | | | 0,000 | 0,032 | 0,015 | 0,012 | 0,013 | | | | |
| 3,1 | 0,245 | 0,234 | 0,170 | 0,133 | 0,139 | | | | 0,000 | -0,011 | -0,075 | -0,112 | -0,106 | | | | |
| | 0,252 | 0,242 | 0,189 | 0,156 | 0,156 | 0,149 | 0,147 | 0,124 | 0,000 | -0,010 | -0,063 | -0,096 | -0,096 | -0,103 | -0,105 | -0,128 | |
| | 0,243 | 0,237 | 0,177 | 0,141 | 0,143 | | | | 0,000 | -0,006 | -0,066 | -0,102 | -0,100 | | | | |
| 6,3 | 0,263 | 0,235 | 0,179 | 0,164 | 0,173 | | | | 0,000 | -0,028 | -0,084 | -0,099 | -0,090 | | | | |
| | 0,250 | 0,217 | 0,186 | 0,161 | 0,158 | 0,154 | 0,174 | 0,126 | 0,000 | -0,033 | -0,064 | -0,089 | -0,092 | -0,096 | -0,076 | -0,124 | |
| | 0,254 | 0,244 | 0,192 | 0,166 | 0,165 | | | | 0,000 | -0,010 | -0,062 | -0,088 | -0,089 | | | | |
| 12,5 | 0,245 | 0,216 | 0,162 | 0,153 | 0,152 | | | | 0,000 | -0,029 | -0,083 | -0,092 | -0,093 | | | | |
| | 0,253 | 0,213 | 0,187 | 0,167 | 0,169 | 0,152 | 0,145 | 0,137 | 0,000 | -0,040 | -0,066 | -0,086 | -0,084 | -0,101 | -0,108 | -0,116 | |
| | 0,249 | 0,224 | 0,175 | 0,155 | 0,159 | | | | 0,000 | -0,025 | -0,074 | -0,094 | -0,090 | | | | |
| 25,0 | 0,245 | 0,215 | 0,157 | 0,158 | 0,152 | | | | 0,000 | -0,030 | -0,088 | -0,087 | -0,093 | | | | |
| | 0,253 | 0,210 | 0,179 | 0,170 | 0,157 | 0,152 | 0,132 | 0,146 | 0,000 | -0,043 | -0,074 | -0,083 | -0,096 | -0,101 | -0,121 | -0,107 | |
| | 0,247 | 0,211 | 0,170 | 0,158 | 0,149 | | | | 0,000 | -0,036 | -0,077 | -0,089 | -0,098 | | | | |
| 50,0 | 0,255 | 0,225 | 0,184 | 0,168 | 0,162 | | | | 0,000 | -0,030 | -0,071 | -0,087 | -0,093 | | | | |
| | 0,247 | 0,203 | 0,180 | 0,141 | 0,150 | 0,142 | 0,097 | 0,096 | 0,000 | -0,044 | -0,067 | -0,106 | -0,097 | -0,105 | -0,150 | -0,151 | |
| | 0,255 | 0,208 | 0,192 | 0,161 | 0,158 | | | | 0,000 | -0,047 | -0,063 | -0,094 | -0,097 | | | | |
| 100,0 | 0,240 | 0,224 | 0,180 | 0,150 | 0,100 | | | | 0,000 | -0,016 | -0,060 | -0,090 | -0,140 | | | | |
| | 0,248 | 0,210 | 0,175 | 0,141 | 0,098 | 0,078 | 0,078 | 0,086 | 0,000 | -0,038 | -0,073 | -0,107 | -0,150 | -0,170 | -0,170 | -0,162 | |
| | 0,251 | 0,200 | 0,165 | 0,142 | 0,095 | | | | 0,000 | -0,051 | -0,086 | -0,109 | -0,156 | | | | |

Tabla A VI.15.

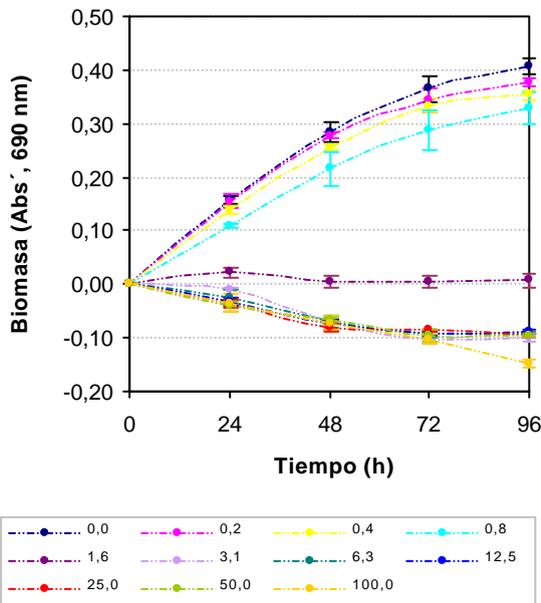
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs')

| t (h) | mg/L COBRE (II) | | | | | | | | | | | |
|-------|-----------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,1 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | |
| 24 | 0,157 | 0,155 | 0,139 | 0,109 | 0,022 | -0,009 | -0,024 | -0,031 | -0,036 | -0,040 | -0,035 | Promedio |
| | 0,006 | 0,014 | 0,009 | 0,005 | 0,011 | 0,003 | 0,012 | 0,008 | 0,007 | 0,009 | 0,018 | DesvEst |
| 48 | 0,284 | 0,278 | 0,256 | 0,215 | 0,006 | -0,068 | -0,070 | -0,074 | -0,080 | -0,067 | -0,073 | Promedio |
| | 0,018 | 0,006 | 0,004 | 0,030 | 0,011 | 0,006 | 0,012 | 0,009 | 0,007 | 0,004 | 0,013 | DesvEst |
| 72 | 0,364 | 0,343 | 0,333 | 0,287 | 0,005 | -0,103 | -0,092 | -0,091 | -0,086 | -0,096 | -0,102 | Promedio |
| | 0,025 | 0,023 | 0,013 | 0,037 | 0,011 | 0,008 | 0,006 | 0,004 | 0,003 | 0,010 | 0,010 | DesvEst |
| 96 | 0,406 | 0,378 | 0,354 | 0,328 | 0,007 | -0,101 | -0,090 | -0,089 | -0,096 | -0,096 | -0,149 | Promedio |
| | 0,016 | 0,009 | 0,010 | 0,030 | 0,013 | 0,005 | 0,002 | 0,005 | 0,003 | 0,002 | 0,008 | DesvEst |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

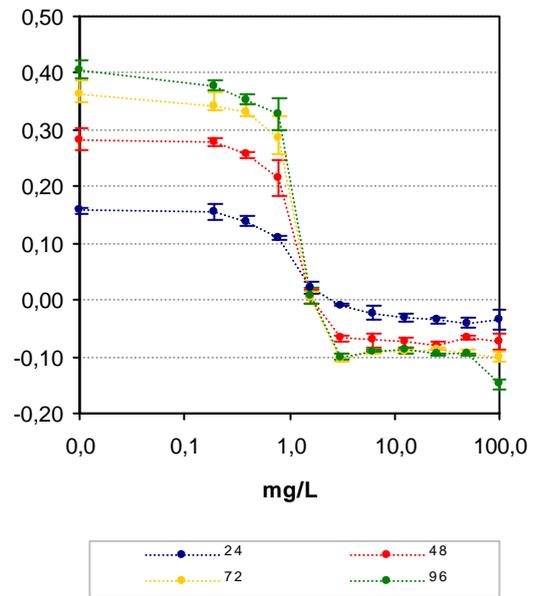


Tabla A VI.16.

Valores de NOEC y LOEC experimentales obtenidos para *C. gracilis* expuesta a diferentes concentraciones de COBRE (II).

| <i>C. gracilis</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas (**) | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,983 | | 0,960 | | 0,960 | | 0,965 | |
| B calculado | 7,54 | | 13,47 | | 17,21 | | 17,21 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L Cu (II) | t _i | p |
| 0,2 | 0,29 | 0,40138 | 0,56 | 0,30325 | 1,53 | 0,17 | 0,91 | 0,02440 |
| 0,4 | 2,25 | 0,02244 | 2,57 | 0,02877 | 2,31 | 0,05995 | 1,68 | 0,00394 |
| 0,8 | 5,89 (*) | 0,00025 | 6,34 (*) | 0,01401 | 5,68 (*) | 0,01895 | 2,55 | 0,00799 |
| 1,6 | 16,60 | 0,00002 | 25,80 | 0,00001 | 26,24 | 0,00001 | 14,79 (*) | 0,00000 |
| 3,1 | 20,40 | 0,00000 | 32,63 | 0,00000 | 34,18 | 0,00000 | 19,79 | 0,00000 |
| 6,3 | 22,20 | 0,00001 | 32,82 | 0,00000 | 33,35 | 0,00000 | 19,29 | 0,00000 |
| 12,5 | 23,14 | 0,00000 | 33,22 | 0,00000 | 33,25 | 0,00000 | 19,22 | 0,00000 |
| 25,0 | 23,75 | 0,00000 | 33,72 | 0,00000 | 32,94 | 0,00000 | 19,55 | 0,00000 |
| 50,0 | 24,24 | 0,00000 | 32,54 | 0,00000 | 33,62 | 0,00000 | 19,55 | 0,00000 |
| 100,0 | 23,59 | 0,00003 | 33,10 | 0,00000 | 34,08 | 0,00000 | 22,22 | 0,00000 |
| MSD | 0,022 | | 0,028 | | 0,036 | | 0,026 | |
| % reducción | 13,68 | | 10,03 | | 9,91 | | 17,49 | |
| <p><i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1. y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,973 | | 0,969 | | 0,963 | | 0,953 | | 0,954 | | 0,960 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 5,03 | | 7,64 | | 11,26 | | 15,75 | | 16,61 | | 17,21 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L Cu (II) | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,2 | 1,19 | 0,17 | 1,27 | 0,17 | 1,36 | 0,17 | 1,44 | 0,17 | 1,49 | 0,17 | 1,53 | 0,17 |
| 0,4 | 1,79 | 0,06 | 1,92 | 0,06 | 2,04 | 0,06 | 2,17 | 0,06 | 2,25 | 0,06 | 2,31 | 0,06 |
| 0,8 | 4,38(*) | 0,02 | 4,71(*) | 0,02 | 5,01(*) | 0,02 | 5,31(*) | 0,02 | 5,51(*) | 0,02 | 5,68(*) | 0,02 |
| 1,6 | 20,27 | 0,00 | 21,75 | 0,00 | 23,18 | 0,00 | 24,55 | 0,00 | 25,47 | 0,00 | 26,24 | 0,00 |
| 3,1 | 26,40 | 0,00 | 28,33 | 0,00 | 30,20 | 0,00 | 31,98 | 0,00 | 33,18 | 0,00 | 34,18 | 0,00 |
| 6,3 | --- | --- | 27,65 | 0,00 | 29,46 | 0,00 | 31,20 | 0,00 | 32,38 | 0,00 | 33,35 | 0,00 |
| 12,5 | --- | --- | --- | --- | 29,38 | 0,00 | 31,11 | 0,00 | 32,28 | 0,00 | 33,25 | 0,00 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 30,81 | 0,00 | 31,97 | 0,00 | 32,94 | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 32,64 | 0,00 | 33,62 | 0,00 |
| 100,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 34,08 | 0,00 |
| MSD | 0,044 | | 0,042 | | 0,040 | | 0,038 | | 0,037 | | 0,036 | |
| % reducción | 12,15 | | 11,46 | | 10,88 | | 10,36 | | 10,06 | | 9,91 | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | | | | | |

Tabla A VI.17.
Valores de ICp del ensayo de *C. gracilis* y Cu (II) a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de Cu (II) estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,1692 | -0,0208 | 0,0787 | 0,2090 | 0,4551 | 0,7697 | 0,1127 |
| | 25 | 0,8183 | 0,4544 | 0,6450 | 0,8071 | 0,9081 | 1,0070 | 0,0657 |
| | 50 | 1,0715 | 0,9137 | 0,9963 | 1,0695 | 1,1293 | 1,1929 | 0,0341 |
| | 75 | 1,3246 | 1,2370 | 1,2829 | 1,3245 | 1,3575 | 1,3936 | 0,0194 |
| | 95 | 1,5272 | 1,4871 | 1,5081 | 1,5284 | 1,5471 | 1,5689 | 1,5689 |
| 96 | 5 | 0,1382 | 0,0469 | 0,0947 | 0,1501 | 0,2488 | 0,3704 | 0,0439 |
| | 25 | 0,8369 | 0,6331 | 0,7399 | 0,8342 | 0,8963 | 0,9617 | 0,0380 |
| | 50 | 1,0846 | 0,9900 | 1,0396 | 1,0839 | 1,1253 | 1,1701 | 0,0227 |
| | 75 | 1,3323 | 1,2671 | 1,3013 | 1,3331 | 1,3592 | 1,3887 | 0,0150 |
| | 95 | 1,5305 | 1,4892 | 1,5109 | 1,5317 | 1,5525 | 1,5768 | 0,0133 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

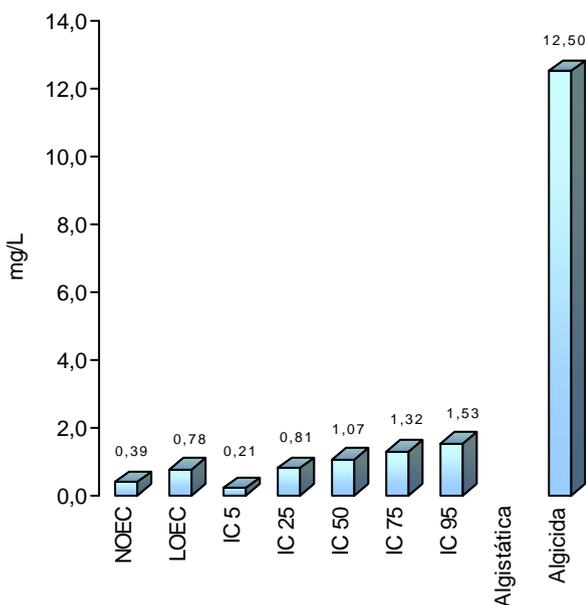
Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de Cu (II) ensayadas con *C. gracilis* (100, 50, 25 y 12,5 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo no se observó cambios en la biomasa de los viales inoculados para este estudio. Así pues se define la concentración alguicida a la menor de las concentraciones ensayadas, y en este caso, la concentración alguistática no se ha podido determinar experimentalmente:

- Concentración alguistática= No se ha determinado experimentalmente
- Concentración alguicida= 12,5 mg/L

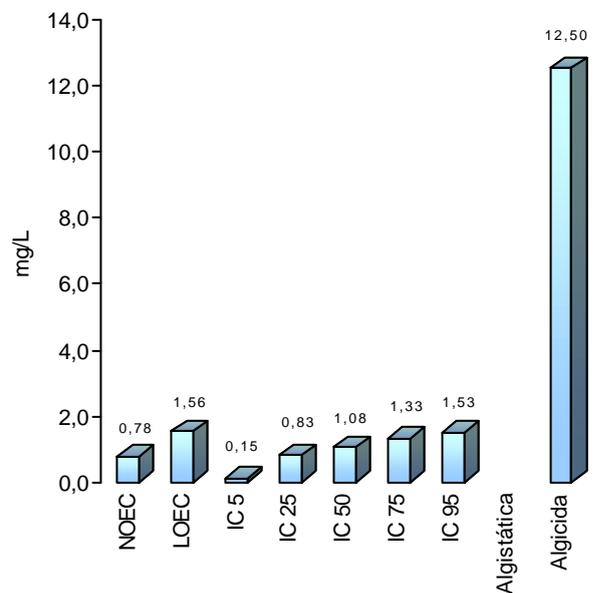
RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de *cobre* y *C. gracilis*.

Resumen de resultados de toxicidad
Perido de exposición=72 h



Resumen de resultados de toxicidad
Perido de exposición=96 h



2.5. *Tetraselmis chuii*

Tabla A VI.18.

Evolución de la biomasa de *Tetraselmis chuii*. Ensayo de COBRE (II).

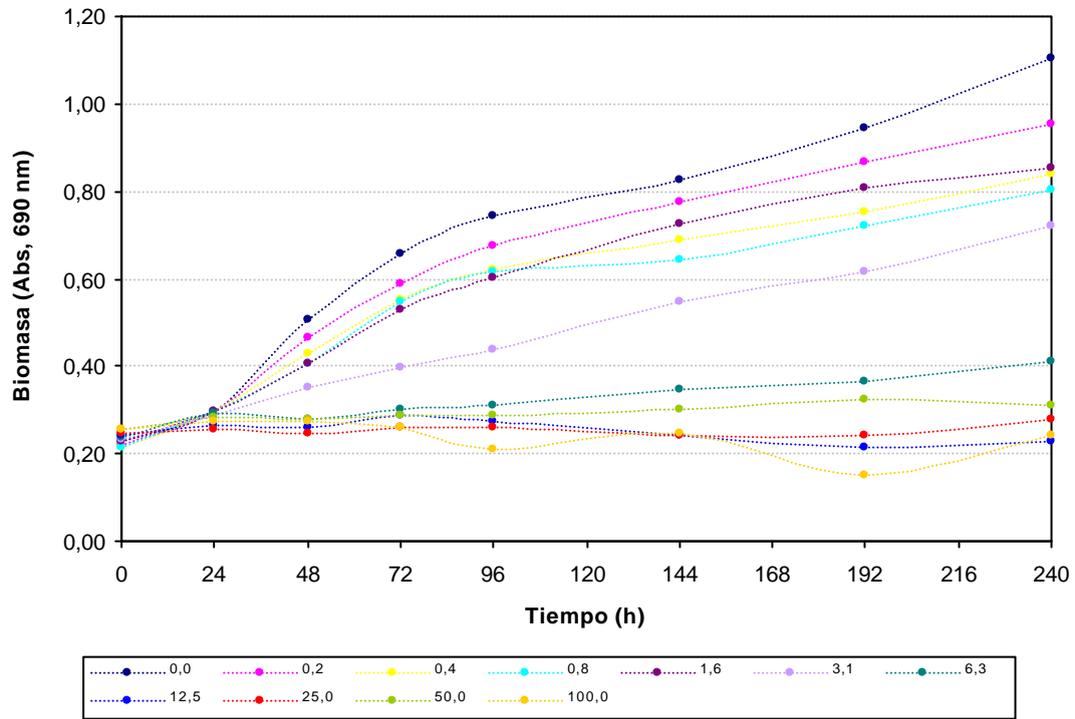
| <i>T. chuii</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| 0,0 | 0,249 | 0,322 | 0,481 | 0,641 | 0,706 | | | | 0,000 | 0,073 | 0,232 | 0,392 | 0,457 | | | | |
| | 0,212 | 0,272 | 0,491 | 0,625 | 0,715 | 0,827 | 0,946 | 1,104 | 0,000 | 0,060 | 0,279 | 0,413 | 0,503 | 0,615 | 0,734 | 0,892 | |
| | 0,227 | 0,293 | 0,554 | 0,701 | 0,813 | | | | 0,000 | 0,066 | 0,327 | 0,474 | 0,586 | | | | |
| 0,2 | 0,219 | 0,316 | 0,464 | 0,590 | 0,673 | | | | 0,000 | 0,097 | 0,245 | 0,371 | 0,454 | | | | |
| | 0,227 | 0,282 | 0,460 | 0,586 | 0,678 | 0,777 | 0,867 | 0,953 | 0,000 | 0,055 | 0,233 | 0,359 | 0,451 | 0,550 | 0,640 | 0,726 | |
| | 0,213 | 0,286 | 0,472 | 0,593 | 0,670 | | | | 0,000 | 0,073 | 0,259 | 0,380 | 0,457 | | | | |
| 0,4 | 0,212 | 0,287 | 0,411 | 0,528 | 0,593 | | | | 0,000 | 0,075 | 0,199 | 0,316 | 0,381 | | | | |
| | 0,201 | 0,293 | 0,428 | 0,550 | 0,598 | 0,690 | 0,754 | 0,841 | 0,000 | 0,092 | 0,227 | 0,349 | 0,397 | 0,489 | 0,553 | 0,640 | |
| | 0,232 | 0,310 | 0,451 | 0,580 | 0,672 | | | | 0,000 | 0,078 | 0,219 | 0,348 | 0,440 | | | | |
| 0,8 | 0,216 | 0,332 | 0,442 | 0,649 | 0,678 | | | | 0,000 | 0,116 | 0,226 | 0,433 | 0,462 | | | | |
| | 0,219 | 0,276 | 0,377 | 0,480 | 0,557 | 0,642 | 0,723 | 0,802 | 0,000 | 0,057 | 0,158 | 0,261 | 0,338 | 0,423 | 0,504 | 0,583 | |
| | 0,208 | 0,284 | 0,402 | 0,509 | 0,617 | | | | 0,000 | 0,076 | 0,194 | 0,301 | 0,409 | | | | |
| 1,6 | 0,213 | 0,299 | 0,398 | 0,550 | 0,633 | | | | 0,000 | 0,086 | 0,185 | 0,337 | 0,420 | | | | |
| | 0,239 | 0,304 | 0,419 | 0,518 | 0,583 | 0,727 | 0,809 | 0,854 | 0,000 | 0,065 | 0,180 | 0,279 | 0,344 | 0,488 | 0,570 | 0,615 | |
| | 0,238 | 0,289 | 0,403 | 0,523 | 0,596 | | | | 0,000 | 0,051 | 0,165 | 0,285 | 0,358 | | | | |
| 3,1 | 0,247 | 0,300 | 0,375 | 0,421 | 0,457 | | | | 0,000 | 0,053 | 0,128 | 0,174 | 0,210 | | | | |
| | 0,219 | 0,292 | 0,361 | 0,390 | 0,447 | 0,548 | 0,618 | 0,722 | 0,000 | 0,073 | 0,142 | 0,171 | 0,228 | 0,329 | 0,399 | 0,503 | |
| | 0,226 | 0,274 | 0,323 | 0,374 | 0,410 | | | | 0,000 | 0,048 | 0,097 | 0,148 | 0,184 | | | | |
| 6,3 | 0,248 | 0,310 | 0,288 | 0,313 | 0,318 | | | | 0,000 | 0,062 | 0,040 | 0,065 | 0,070 | | | | |
| | 0,235 | 0,278 | 0,281 | 0,304 | 0,317 | 0,345 | 0,365 | 0,411 | 0,000 | 0,043 | 0,046 | 0,069 | 0,082 | 0,110 | 0,130 | 0,176 | |
| | 0,235 | 0,284 | 0,265 | 0,291 | 0,297 | | | | 0,000 | 0,049 | 0,030 | 0,056 | 0,062 | | | | |
| 12,5 | 0,245 | 0,259 | 0,263 | 0,296 | 0,280 | | | | 0,000 | 0,014 | 0,018 | 0,051 | 0,035 | | | | |
| | 0,245 | 0,284 | 0,251 | 0,293 | 0,268 | 0,244 | 0,216 | 0,229 | 0,000 | 0,039 | 0,006 | 0,048 | 0,023 | -0,001 | -0,029 | -0,016 | |
| | 0,240 | 0,257 | 0,267 | 0,268 | 0,274 | | | | 0,000 | 0,017 | 0,027 | 0,028 | 0,034 | | | | |
| 25,0 | 0,245 | 0,254 | 0,247 | 0,277 | 0,275 | | | | 0,000 | 0,009 | 0,002 | 0,032 | 0,030 | | | | |
| | 0,249 | 0,267 | 0,253 | 0,251 | 0,265 | 0,244 | 0,240 | 0,278 | 0,000 | 0,018 | 0,004 | 0,002 | 0,016 | -0,005 | -0,009 | 0,029 | |
| | 0,240 | 0,243 | 0,241 | 0,253 | 0,244 | | | | 0,000 | 0,003 | 0,001 | 0,013 | 0,004 | | | | |
| 50,0 | 0,254 | 0,291 | 0,265 | 0,301 | 0,305 | | | | 0,000 | 0,037 | 0,011 | 0,047 | 0,051 | | | | |
| | 0,253 | 0,274 | 0,286 | 0,283 | 0,284 | 0,303 | 0,325 | 0,311 | 0,000 | 0,021 | 0,033 | 0,030 | 0,031 | 0,050 | 0,072 | 0,058 | |
| | 0,253 | 0,286 | 0,285 | 0,282 | 0,271 | | | | 0,000 | 0,033 | 0,032 | 0,029 | 0,018 | | | | |
| 100,0 | 0,248 | 0,264 | 0,273 | 0,261 | 0,214 | | | | 0,000 | 0,016 | 0,025 | 0,013 | -0,034 | | | | |
| | 0,256 | 0,297 | 0,274 | 0,277 | 0,219 | 0,247 | 0,152 | 0,240 | 0,000 | 0,041 | 0,018 | 0,021 | -0,037 | -0,009 | -0,104 | -0,016 | |
| | 0,260 | 0,256 | 0,279 | 0,246 | 0,203 | | | | 0,000 | -0,004 | 0,019 | -0,014 | -0,057 | | | | |

Tabla A VI.19.

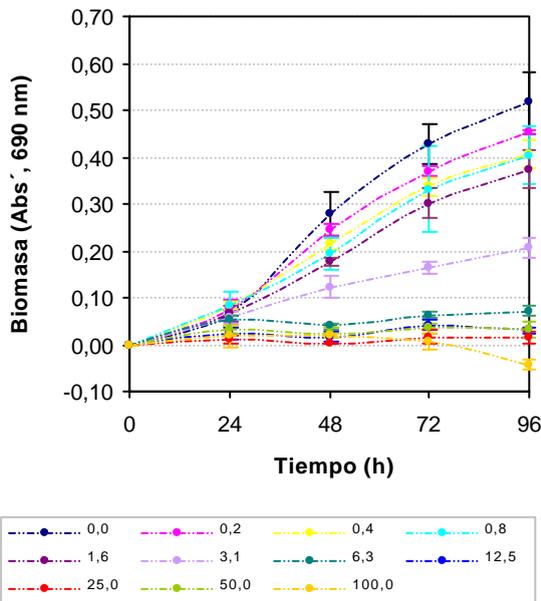
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs')

| t (h) | mg/L COBRE (II) | | | | | | | | | | | Promedio |
|-----------|-----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|----------|
| | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,1 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | |
| 24 | 0,066 | 0,075 | 0,082 | 0,083 | 0,067 | 0,058 | 0,051 | 0,010 | 0,023 | 0,021 | 0,021 | DesvEst |
| | 0,007 | 0,021 | 0,009 | 0,030 | 0,018 | 0,013 | 0,010 | 0,008 | 0,014 | 0,005 | 0,018 | |
| 48 | 0,279 | 0,246 | 0,215 | 0,179 | 0,152 | 0,122 | 0,039 | 0,002 | 0,017 | 0,027 | 0,021 | DesvEst |
| | 0,028 | 0,013 | 0,014 | 0,024 | 0,028 | 0,023 | 0,008 | 0,002 | 0,011 | 0,006 | 0,004 | |
| 72 | 0,426 | 0,370 | 0,338 | 0,300 | 0,270 | 0,164 | 0,063 | 0,016 | 0,042 | 0,021 | 0,007 | DesvEst |
| | 0,043 | 0,011 | 0,019 | 0,038 | 0,052 | 0,014 | 0,007 | 0,015 | 0,013 | 0,011 | 0,018 | |
| 96 | 0,515 | 0,475 | 0,406 | 0,393 | 0,347 | 0,207 | 0,071 | 0,017 | 0,024 | -0,028 | -0,043 | DesvEst |
| | 0,065 | 0,045 | 0,031 | 0,049 | 0,063 | 0,022 | 0,010 | 0,013 | 0,011 | 0,007 | 0,013 | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

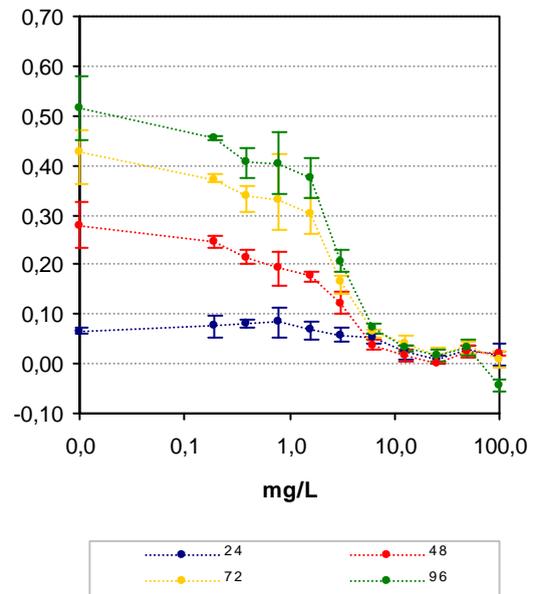


Tabla A VI.20.

Valores de NOEC y LOEC experimentales obtenidos para *T. chuii* expuesta a diferentes concentraciones de COBRE (II).

| <i>T. chuii</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,961 | | 0,960 | | 0,949 | | 0,967 | |
| B calculado | 9,35 | | 17,25 | | 14,16 | | 18,20 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L Cu (II) | t _i | p |
| 0,2 | -0,68 | 0,26672 | 2,39 | 0,06388 | 2,63 | 0,04512 | 1,37 | 0,21173 |
| 0,4 | -1,21 | 0,03805 | 4,57 (*) | 0,01150 | 4,15 (*) | 0,01498 | 3,67 (*) | 0,02925 |
| 0,8 | -1,32 | 0,20092 | 7,11 | 0,00463 | 5,92 | 0,00921 | 4,11 | 0,03023 |
| 1,6 | -0,08 | 0,46547 | 9,05 | 0,00244 | 7,29 | 0,00802 | 5,66 | 0,01622 |
| 3,1 | 0,66 | 0,19149 | 11,16 | 0,00081 | 12,25 | 0,00027 | 10,35 | 0,00075 |
| 6,3 | 1,18 | 0,04519 | 17,10 | 0,00007 | 16,97 | 0,00006 | 14,92 | 0,00016 |
| 12,5 | 4,45 (*) | 0,00031 | 19,69 | 0,00003 | 19,20 | 0,00005 | 16,76 | 0,00010 |
| 25,0 | 3,39 | 0,00395 | 18,64 | 0,00005 | 17,95 | 0,00006 | 16,51 | 0,00011 |
| 50,0 | 3,60 | 0,00033 | 17,96 | 0,00005 | 18,95 | 0,00005 | 18,25 | 0,00007 |
| 100,0 | 3,58 | 0,00745 | 18,38 | 0,00004 | 19,62 | 0,00005 | 18,75 | 0,00007 |
| MSD | 0,033 | | 0,037 | | 0,056 | | 0,079 | |
| % reducción | 50,43 | | 13,30 | | 13,24 | | 15,24 | |
| <p><i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,954 | | 0,950 | | 0,954 | | 0,948 | | 0,944 | | 0,949 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 5,87 | | 9,55 | | 10,63 | | 12,12 | | 13,80 | | 14,16 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L Cu (II) | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,2 | 2,07 | 0,05 | 2,23 | 0,05 | 2,34 | 0,05 | 2,46 | 0,05 | 2,57 | 0,05 | 2,63 | 0,05 |
| 0,4 | 3,26(*) | 0,01 | 3,51(*) | 0,01 | 3,69(*) | 0,01 | 3,87(*) | 0,01 | 4,04(*) | 0,01 | 4,15(*) | 0,01 |
| 0,8 | 4,66 | 0,01 | 5,01 | 0,01 | 5,27 | 0,01 | 5,53 | 0,01 | 5,78 | 0,01 | 5,92 | 0,01 |
| 1,6 | 5,73 | 0,01 | 6,17 | 0,01 | 6,49 | 0,01 | 6,81 | 0,01 | 7,11 | 0,01 | 7,29 | 0,01 |
| 3,1 | 9,63 | 0,00 | 10,37 | 0,00 | 10,90 | 0,00 | 11,43 | 0,00 | 11,95 | 0,00 | 12,25 | 0,00 |
| 6,3 | --- | --- | 14,37 | 0,00 | 15,10 | 0,00 | 15,84 | 0,00 | 16,56 | 0,00 | 16,97 | 0,00 |
| 12,5 | --- | --- | --- | --- | 17,08 | 0,00 | 17,92 | 0,00 | 18,73 | 0,00 | 19,20 | 0,00 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 16,76 | 0,00 | 17,51 | 0,00 | 17,95 | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 18,49 | 0,00 | 18,95 | 0,00 |
| 100,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 19,62 | 0,00 |
| MSD | 0,068 | | 0,064 | | 0,062 | | 0,059 | | 0,057 | | 0,056 | |
| % reducción | 15,95 | | 14,99 | | 14,43 | | 13,87 | | 13,37 | | 13,24 | |
| <p>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola)</p> | | | | | | | | | | | | |

Tabla A VI.21.
Valores de ICp del ensayo de *T. chuii* y Cu (II) a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de Cu (II) estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,0738 | 0,0159 | 0,0462 | 0,0861 | 0,1768 | 0,2902 | 0,0479 |
| | 25 | 1,0784 | -0,5652 | 0,2957 | 0,9908 | 1,7506 | 2,4900 | 0,4586 |
| | 50 | 2,5641 | 1,9086 | 2,2520 | 2,5461 | 2,8050 | 3,0698 | 0,1433 |
| | 75 | 4,9118 | 4,0207 | 1,4875 | 4,9103 | 5,2402 | 5,6015 | 0,1943 |
| | 95 | 60,5462 | (**) | (**) | 57,6853 | (**) | (**) | |
| 96 | 5 | 0,0819 | 0,0015 | 0,0436 | 0,1046 | 0,2659 | 0,4682 | 0,0622 |
| | 25 | 1,2259 | -0,7991 | 0,2616 | 1,1146 | 1,9000 | 2,6415 | 0,5471 |
| | 50 | 1,2259 | -0,7276 | 0,2957 | 1,1142 | 1,9163 | 2,6758 | 0,5334 |
| | 75 | 4,9288 | 3,9513 | 4,4633 | 4,9260 | 5,3175 | 5,7451 | 0,2238 |
| | 95 | 23,3088 | 0,0571 | 12,2366 | 36,0413 | 63,5377 | 107,7895 | 19,0116 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

(**) No es posible calcular límites de confianza

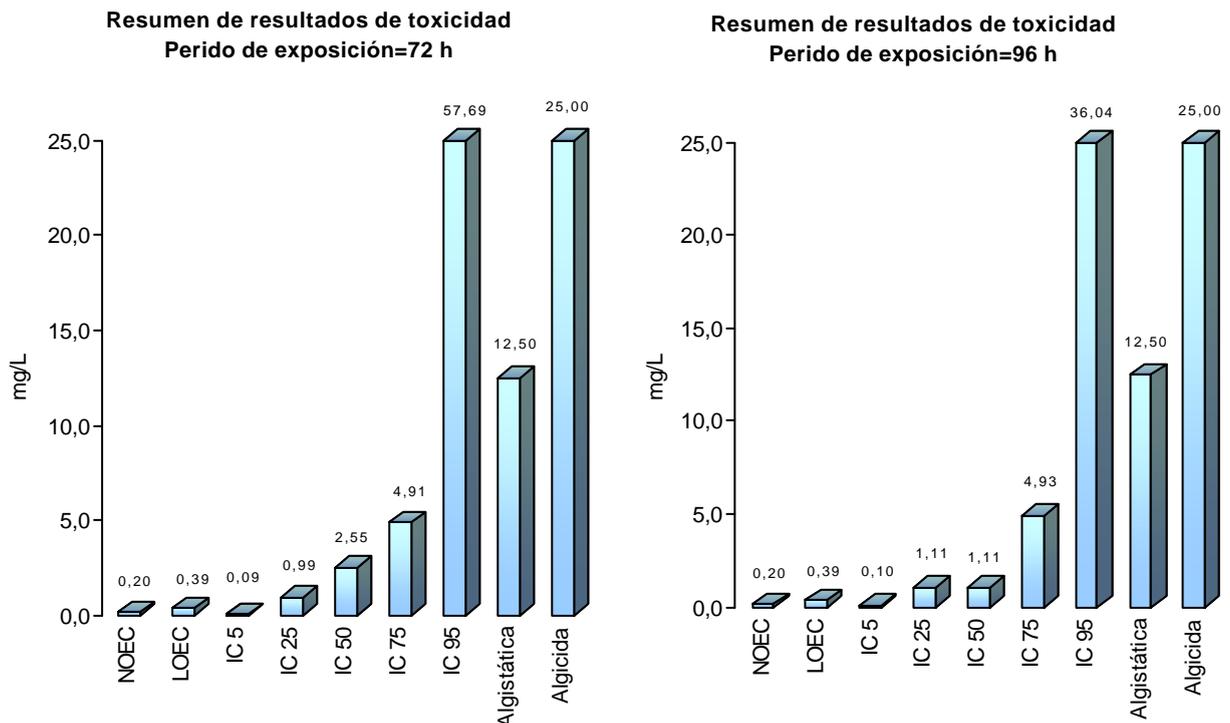
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de Cu (II) ensayadas con *T. chuii* (100, 50, 25 y 12,5 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo no se observó cambios en la biomasa de los viales correspondientes a las tres máximas concentraciones, pero si se observó un aumento de biomasa en el vial correspondiente a 12,5 mg/L.

- Concentración alguistática= 12,5 mg/L
- Concentración alguicida= 25 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad de *cobre* y *T. chuii*.



3. RESULTADOS CON ARTEMIA

3.1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Recipiente de ensayo: placas petri de vidrio
- N° de réplicas: 5 para cada concentración y control
- N° de organismos por placa: 10
- Volumen de las placas: 30 mL
- Volumen de solución de ensayo: 20 mL
- Agua de dilución: agua de mar sintética
- Medio nutriente adicional: no
- Temperatura de ensayo: $20 \pm 0,1$ °C
- Iluminación: no, oscuridad
- Aireación: no
- Duración del ensayo: 3 días
- Respuesta observada: mortalidad, inhibición en la capacidad natatoria

ORGANISMOS DE ENSAYO

- *Artemia franciscana*, código 1309 según clasificación del Instituto de la *Artemia*, Bélgica obtenidos a partir de la eclosión de quistes de resistencia en condiciones óptimas de luz (iluminación constante), aireación (continua) y temperatura ($20 \pm 0,1$ °C).
- Nauplios de una misma cohorte de *Artemia franciscana* de entre 6 a 12 horas de vida (estadio I)

RESULTADOS OBTENIDOS

- Número de supervivientes a las 24, 48 y 72 horas de ensayo
- LC_p mediante el método Probit

3.2 RESULTADOS OBTENIDOS

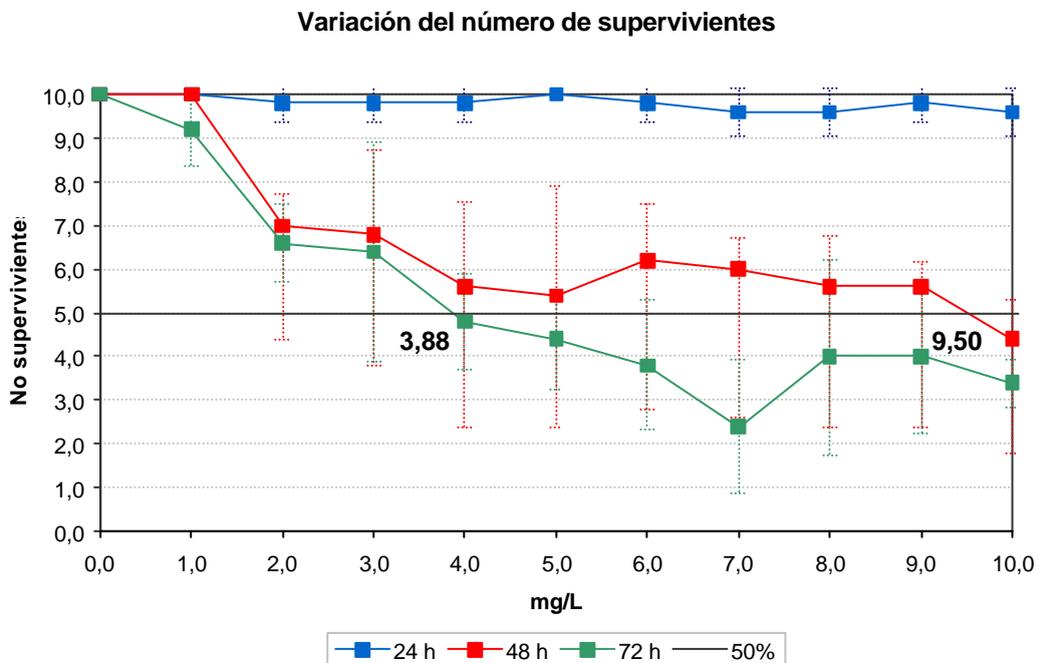
Tabla A VI.22.
Ensayos de toxicidad aguda con *Artemia*. Ensayo de COBRE (II).

| mg/L Cu (II) | 24 h | | | 48 h | | | 72 h | | | N Total |
|--------------|------|---|---|------|---|---|------|---|----|---------|
| | + | ± | - | + | ± | - | + | ± | - | |
| 0,000 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| 1,0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 7 | 2 | 1 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 7 | 3 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 6 | 3 | 1 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 7 | 1 | 2 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 8 | 2 | 0 | 10 |
| 2,0 | 10 | 0 | 0 | 7 | 0 | 3 | 5 | 3 | 2 | 10 |
| | 9 | 0 | 1 | 6 | 1 | 3 | 5 | 2 | 3 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 3 | 3 | 4 | 3 | 3 | 4 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 4 | 3 | 3 | 4 | 2 | 4 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 2 | 6 | 2 | 1 | 5 | 4 | 10 |
| 3,0 | 10 | 0 | 0 | 3 | 4 | 3 | 1 | 6 | 3 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 9 | 1 | 0 | 9 | 1 | 0 | 10 |
| | 9 | 0 | 1 | 1 | 4 | 5 | 1 | 3 | 6 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 2 | 4 | 4 | 2 | 5 | 3 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 4 | 2 | 4 | 3 | 1 | 6 | 10 |
| 4,0 | 8 | 2 | 0 | 1 | 4 | 5 | 0 | 5 | 5 | 10 |
| | 8 | 1 | 1 | 2 | 3 | 5 | 1 | 5 | 4 | 10 |
| | 9 | 1 | 0 | 5 | 3 | 2 | 1 | 4 | 5 | 10 |
| | 9 | 1 | 0 | 0 | 3 | 7 | 1 | 2 | 7 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 4 | 3 | 3 | 2 | 3 | 5 | 10 |
| 5,0 | 7 | 3 | 0 | 1 | 2 | 7 | 0 | 3 | 7 | 10 |
| | 9 | 1 | 0 | 0 | 9 | 1 | 4 | 2 | 4 | 10 |
| | 8 | 2 | 0 | 1 | 2 | 7 | 3 | 1 | 6 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 5 | 1 | 4 | 4 | 1 | 5 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 5 | 1 | 4 | 4 | 0 | 6 | 10 |
| 6,0 | 10 | 0 | 0 | 1 | 7 | 2 | 0 | 3 | 7 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | 5 | 5 | 0 | 2 | 8 | 10 |
| | 8 | 1 | 1 | 4 | 2 | 4 | 4 | 0 | 6 | 10 |
| | 8 | 2 | 0 | 3 | 2 | 5 | 2 | 2 | 6 | 10 |
| | 8 | 2 | 0 | 6 | 1 | 3 | 5 | 1 | 4 | 10 |
| 7,0 | 8 | 2 | 0 | 4 | 3 | 3 | 1 | 3 | 6 | 10 |
| | 7 | 2 | 1 | 3 | 3 | 4 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 7 | 2 | 1 | 2 | 3 | 5 | 1 | 2 | 7 | 10 |
| | 6 | 4 | 0 | 4 | 2 | 4 | 2 | 0 | 8 | 10 |
| | 6 | 4 | 0 | 0 | 6 | 4 | 1 | 2 | 7 | 10 |
| 8,0 | 5 | 5 | 0 | 2 | 4 | 4 | 2 | 2 | 6 | 10 |
| | 8 | 1 | 1 | 6 | 1 | 3 | 4 | 3 | 3 | 10 |
| | 5 | 5 | 0 | 3 | 2 | 5 | 2 | 1 | 7 | 10 |
| | 7 | 3 | 0 | 1 | 5 | 4 | 0 | 5 | 5 | 10 |
| | 9 | 0 | 1 | 0 | 4 | 6 | 0 | 1 | 9 | 10 |
| 9,0 | 9 | 1 | 0 | 3 | 2 | 5 | 3 | 1 | 6 | 10 |
| | 9 | 1 | 0 | 1 | 5 | 4 | 1 | 4 | 5 | 10 |
| | 7 | 2 | 1 | 4 | 2 | 4 | 1 | 4 | 5 | 10 |
| | 8 | 2 | 0 | 3 | 3 | 4 | 1 | 4 | 5 | 10 |
| | 9 | 1 | 0 | 1 | 4 | 5 | 0 | 1 | 9 | 10 |
| 10,0 | 7 | 3 | 0 | 1 | 4 | 5 | 0 | 3 | 7 | 10 |
| | 6 | 3 | 1 | 1 | 4 | 5 | 0 | 4 | 6 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 2 | 1 | 7 | 0 | 3 | 7 | 10 |
| | 7 | 3 | 0 | 4 | 1 | 5 | 3 | 1 | 6 | 10 |
| | 9 | 0 | 1 | 1 | 3 | 6 | 0 | 3 | 7 | 10 |

Tabla A VI.23.
Promedios de supervivientes. Ensayo de COBRE (II).

| mg/L Cu (II) | 24 h | | 48 h | | 72 h | | Promedio DesvEst |
|--------------|---------|------|---------|------|---------|------|---------------------|
| | + Total | ± | + Total | ± | + Total | ± | |
| 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 0.2 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 9,2 | 2,2 | |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,84 | 0,84 | |
| 0.4 | 9,8 | 0,0 | 7,0 | 2,6 | 6,6 | 3,0 | |
| | 0,45 | 0,00 | 0,71 | 2,30 | 0,89 | 1,22 | |
| 0.8 | 9,8 | 0,0 | 6,8 | 3,0 | 6,4 | 3,2 | |
| | 0,45 | 0,00 | 1,92 | 1,41 | 2,51 | 2,28 | |
| 1.6 | 9,8 | 1,0 | 5,6 | 3,2 | 4,8 | 3,8 | |
| | 0,45 | 0,71 | 1,95 | 0,45 | 1,10 | 1,30 | |
| 3.1 | 10,0 | 1,2 | 5,4 | 3,0 | 4,4 | 1,4 | |
| | 0,00 | 1,30 | 2,51 | 3,39 | 1,14 | 1,14 | |
| 6.3 | 9,8 | 1,0 | 6,2 | 3,4 | 3,8 | 1,6 | |
| | 0,45 | 1,00 | 1,30 | 2,51 | 1,48 | 1,14 | |
| 12.5 | 9,6 | 2,8 | 6,0 | 3,4 | 2,4 | 1,4 | |
| | 0,55 | 1,10 | 0,71 | 1,52 | 1,52 | 1,34 | |
| 25.0 | 9,6 | 2,8 | 5,6 | 3,2 | 4,0 | 2,4 | |
| | 0,55 | 2,28 | 1,14 | 1,64 | 2,24 | 1,67 | |
| 50.0 | 9,8 | 1,4 | 5,6 | 3,2 | 4,0 | 2,8 | |
| | 0,45 | 0,55 | 0,55 | 1,30 | 1,73 | 1,64 | |
| 100.0 | 9,6 | 1,8 | 4,4 | 2,6 | 3,4 | 2,8 | |
| | 0,55 | 1,64 | 0,89 | 1,52 | 0,55 | 1,10 | |

+ Total: Número total de supervivientes; ±: Número de organismos que presentan un descenso en la capacidad natatoria



Las concentraciones incluidas en la zona interior del gráfico muestran los valores de LC₅₀ obtenidos mediante el método de interpolación gráfica.

Tabla A VI.24.
Resultados obtenidos mediante el método PROBIT

| Ensayo de 24 h | Concentración estimada de Cobre(II) (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|--|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 1,973 | --- | --- |
| LC/EC 5,00 | 16,395 | --- | --- |
| LC/EC 10,00 | 50,692 | --- | --- |
| LC/EC 15,00 | 108,596 | --- | --- |
| LC/EC 50,00 | 2718,488 | --- | --- |
| LC/EC 85,00 | 68052,078 | --- | --- |
| LC/EC 90,00 | 145785,359 | --- | --- |
| LC/EC 95,00 | 450764,031 | --- | --- |
| LC/EC 99,00 | 3744800,000 | --- | --- |

χ^2 calculado=2,771; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. Se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. No se han podido calcular los límites de confianza de las concentraciones estimadas mediante el programa de cálculo

| Ensayo de 48 h | Concentración estimada de Cobre(II) (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|--|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 0,141 | 0,002 | 0,502 |
| LC/EC 5,00 | 0,468 | 0,030 | 1,113 |
| LC/EC 10,00 | 0,887 | 0,116 | 1,716 |
| LC/EC 15,00 | 1,365 | 0,287 | 2,317 |
| LC/EC 50,00 | 8,471 | 5,973 | 18,339 |
| LC/EC 85,00 | 52,557 | 22,148 | 814,318 |
| LC/EC 90,00 | 80,943 | 29,549 | 2041,776 |
| LC/EC 95,00 | 153,479 | 45,157 | 7995,136 |
| LC/EC 99,00 | 509,589 | 99,536 | 103972,195 |

χ^2 calculado=15,872; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados hay que interpretarlos con precaución.

| Ensayo de 72 h | Concentración estimada de Cobre(II) (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|--|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 0,147 | 0,043 | 0,307 |
| LC/EC 5,00 | 0,403 | 0,165 | 0,685 |
| LC/EC 10,00 | 0,689 | 0,340 | 1,055 |
| LC/EC 15,00 | 0,990 | 0,551 | 1,415 |
| LC/EC 50,00 | 4,575 | 3,831 | 5,435 |
| LC/EC 85,00 | 21,148 | 14,989 | 37,111 |
| LC/EC 90,00 | 30,379 | 20,106 | 60,185 |
| LC/EC 95,00 | 51,958 | 30,966 | 123,616 |
| LC/EC 99,00 | 142,169 | 69,257 | 479,237 |

χ^2 calculado=13,014; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. Se cumple la condición de homogeneidad de la varianza.

4. ENSAYOS CON BACTERIAS LUMINISCENTES

4.1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Condiciones del ensayo LUMISTOX
- N° de réplicas: 2 para cada concentración y control
- Duración del ensayo: 30 minutos
- Respuesta observada: luminiscencia de las bacterias

ORGANISMOS DE ENSAYO

- Bacterias luminiscentes proporcionadas por la marca comercial *Dr. Lange* para el ensayo de LUMISTOX

RESULTADOS OBTENIDOS

- Inhibición de la luminiscencia a t=15 min, y t=30 min.

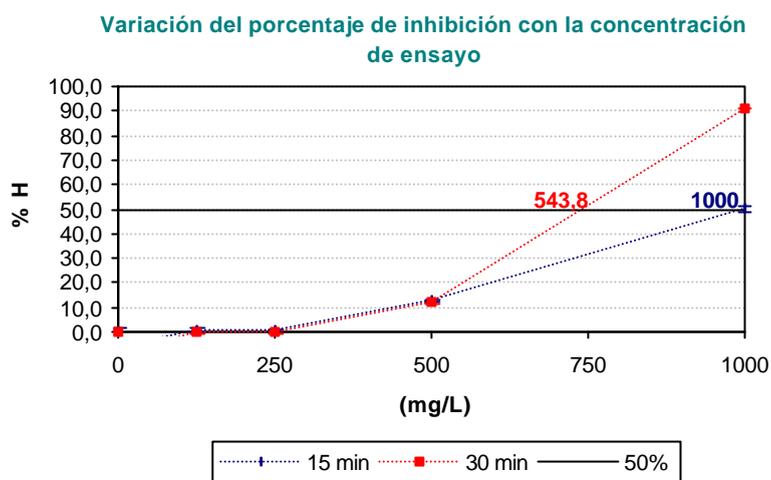
4.2. RESULTADOS OBTENIDOS

Tabla VI.25.
Resultados obtenidos en el ensayo de bacterias luminiscentes y COBRE (II)

| mg/L | Luminiscencia | | | t=15 min | | | t=30 min | | |
|----------|---------------|-------|-------|----------|--------|----------|----------|--------|-------|
| | t=0 | t=15 | t=30 | Icorr | %H | Gamma | Icorr | %H | Gamma |
| 1000 | 1211,9 | 481,7 | 85,3 | 979,72 | 50,83 | 1,03 | 977,13 | 91,27 | 10,45 |
| | 1224,3 | 501,0 | 90,0 | 989,78 | 34,20 | 0,52 | 987,17 | 76,42 | 3,24 |
| 500 | 995,6 | 704,0 | 709,4 | 804,85 | 12,53 | 0,14 | 802,72 | 11,63 | 0,13 |
| | 1053,5 | 739,0 | 740,3 | 851,66 | 13,23 | 0,15 | 849,41 | 12,85 | 0,15 |
| 250 | 958,5 | 770,0 | 778,4 | 774,90 | 0,63 | 0,01 | 772,85 | -0,71 | -0,01 |
| | 981,2 | 785,0 | 783,6 | 793,21 | 1,04 | 0,01 | 791,11 | 0,95 | 0,01 |
| 125 | 972,0 | 784,2 | 789,0 | 785,81 | 0,21 | 0,00 | 783,73 | -0,67 | -0,01 |
| | 990,2 | 787,5 | 797,0 | 800,49 | 1,62 | 0,02 | 798,37 | 0,18 | 0,00 |
| 62,5 | 974,0 | 803,0 | 811,1 | 787,39 | -1,98 | -0,02 | 785,31 | -3,28 | -0,03 |
| | 971,0 | 807,0 | 824,4 | 784,96 | -2,81 | -0,03 | 782,89 | -5,30 | -0,05 |
| 31,25 | 958,2 | 828,5 | 833,3 | 774,66 | -6,95 | -0,07 | 772,61 | -7,85 | -0,07 |
| | 956,7 | 851,9 | 870,0 | 773,44 | -10,14 | -0,09 | 771,40 | -12,78 | -0,11 |
| 15,625 | 954,3 | 859,5 | 891,5 | 771,50 | -11,41 | -0,10 | 769,46 | -15,85 | -0,14 |
| | 928,8 | 871,7 | 894,5 | 750,89 | -16,09 | -0,14 | 748,90 | -19,44 | -0,16 |
| 7,813 | 931,0 | 864,0 | 880,7 | 752,67 | -14,79 | -0,13 | 750,67 | -17,32 | -0,15 |
| | 940,0 | 880,0 | 894,1 | 759,94 | -15,80 | -0,14 | 757,93 | -17,97 | -0,15 |
| 0,000 | 954,3 | 781,2 | 778,4 | 771,50 | -1,26 | -0,01 | 769,46 | -1,16 | -0,01 |
| | 928,8 | 741,5 | 740,3 | 750,89 | 1,26 | 0,01 | 748,90 | 1,16 | 0,01 |
| KF=0,808 | | | | | | KF=0,806 | | | |

Tabla VI.26.
Promedio de los valores de %H del ensayo de COBRE (II)

| | mg/L Cu (II) | | | | | | | | | |
|-----------------|--------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|-----------------|
| | 0,0 | 7,813 | 15,625 | 31,25 | 62,5 | 125 | 250 | 500 | 1000 | |
| t=15 min | 0,00 | -15,30 | -13,75 | -8,55 | -2,39 | 0,91 | 0,83 | 12,88 | 50,11 | Promedio |
| | 1,78 | 0,71 | 3,31 | 2,25 | 0,58 | 1,00 | 0,28 | 0,49 | 1,02 | DesvEst |
| t=30 min | 0,00 | -17,64 | -17,64 | -10,32 | -4,29 | -0,25 | 0,12 | 12,24 | 91,07 | Promedio |
| | 1,63 | 0,46 | 2,53 | 3,49 | 1,43 | 0,60 | 1,17 | 0,86 | 0,27 | DesvEst |



Las concentraciones incluidas en la zona interior del gráfico muestran los valores de LC_{50} obtenidos mediante el método de interpolación gráfica

Tabla A VI.27.
Valores de $EC(p)$ calculados mediante interpolación gráfica

| <i>Lindano (mg/L)</i> | <i>t=15 min</i> | <i>t=30 min</i> |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| EC_5 | 385,0 | 395,0 |
| EC_{25} | 711,2 | 518,9 |
| EC_{50} | 1000,0 | 543,8 |

5. OBJETIVOS DE CALIDAD DEL COBRE (ii). TABLAS DE CÁLCULO. RESULTADOS

Tabla A VI.28. Tabla resumen de los resultados de toxicidad más sensibles (Fact. Seg.=100)

| Resumen de resultados más sensibles de cada grupo de organismos | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos del presente estudio | | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos de toxicidad en agua de mar | | | Valor mínimo obtenidos a partir de la base de datos de toxicidad acuática | | |
|---|---------------------------|---|-------|---------|--|-------|---------|---|-------|---------|
| | | Nº datos | mg/L | x FS | Nº datos | mg/L | x FS | Nº datos | mg/L | x FS |
| Microalgas | NOEC (≤ 96 h) | 9 | 0,195 | 0,00195 | 9 | 0,195 | 0,00195 | 9 | 0,195 | 0,00195 |
| | IC ₅₀ (≤ 96 h) | 10 | 0,790 | 0,00790 | 10 | 0,790 | 0,00790 | 11 | 0,07 | 0,0007 |
| Crustáceos | NOEC (≤ 96 h) | | | | 1 | 0,018 | 0,0018 | 1 | 0,018 | 0,0018 |
| | LOEC (≤ 96 h) | | | | 1 | 0,039 | 0,0039 | 1 | 0,039 | 0,00039 |
| | EC ₅₀ (≤ 96 h) | 3 | 4,575 | 0,04575 | 8 | 0,100 | 0,0010 | 14 | 0,049 | 0,0049 |
| | EC ₅₀ (17 d) | | | | 2 | 0,039 | 0,0039 | 2 | 0,039 | 0,0039 |
| Peces | NOEC (≤ 96 h) | | | | | | | 1 | 1,3 | 0,013 |
| | NOEC (30 d) | | | | | | | 9 | 0,004 | 0,0004 |
| | LOEC (≤ 96 h) | | | | | | | 1 | 1,8 | 0,018 |
| | LOEC (28 d) | | | | | | | 9 | 0,013 | 0,00013 |
| | LC ₅₀ (≤ 96 h) | | | | 2 | 1 | 0,01 | 16 | 0,123 | 0,00123 |
| | LC ₅₀ (28 d) | | | | 1 | 1 | 0,1 | 1 | 0,062 | 0,0062 |

Tabla A VI.29. Valores ecotoxicológicos obtenidos a partir de los valores L(E)C₅₀

| Valor guía obtenido a partir de los valores de L(E)C ₅₀ | Grupo de organismos | Tipo de Respuesta (Aguda o Crónica) | n _i , N | w _i = n _i /N | q _i = Conc·FS | w _i x q _i | Valor Guía = $\sum_{i=1}^n q_i w_i$ |
|--|---------------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Base de datos de toxicidad de este estudio | Algas | A | 10 | 0,7692 | 0,0079 | 0,0061 | 0,0072 mg/L Cobre (II) |
| | Crustáceos | A | 3 | 0,2308 | 0,004575 | 0,0011 | |
| | N total de datos | | | 13 | | | |
| Base de datos de toxicidad en agua de mar | Algas | A | 10 | 0,4348 | 0,0079 | 0,00343 | 0,0093 mg/L Cobre (II) |
| | Crustáceos | A | 8 | 0,3478 | 0,0010 | 0,00035 | |
| | Crustáceos | A | 2 | 0,0870 | 0,0039 | 0,00034 | |
| | peces | A | 2 | 0,0870 | 0,0100 | 0,00087 | |
| | peces | C | 1 | 0,0435 | 0,1000 | 0,00435 | |
| N total de datos | | | 24 | | | | |
| Base de toxicidad acuática | Algas | A | 11 | 0,8462 | 0,0007 | 0,0067 | 0,0090 mg/L Cobre (II) |
| | Crustáceos | A | 14 | 0,3182 | 4,90E-03 | 0,0016 | |
| | Crustáceos | C | 2 | 0,0455 | 0,0039 | 0,0002 | |
| | peces | A | 16 | 0,3636 | 0,00123 | 0,0004 | |
| | peces | C | 1 | 0,0227 | 0,0062 | 0,0001 | |
| N total de datos | | | 44 | | | | |

Tabla A VI.30. Valores ecotoxicológicos obtenidos a partir de los valores NOEC/LOEC

| Valor guía obtenido a partir de los valores NOEC/LOEC | Grupo de organismos | Tipo de Respuesta (Aguda o Crónica) | n_i, N | $w_i = n_i/N$ | $q_i = \text{Conc} \cdot F \cdot S$ | $w_i \times q_i$ | Valor Guía = $\sum_{i=1}^n q_i \cdot w_i$ |
|---|---------------------|-------------------------------------|----------|---------------|-------------------------------------|------------------|---|
| Base de datos de toxicidad de este estudio | Algas | A (NOEC) | 9 | 1,0000 | 0,00195 | 0,0020 | 0,0020 mg/L Cobre (II) |
| | Crustáceos | A (NOEC) | | 0,0000 | | 0,0000 | |
| | N total de datos | | 9 | | | | |
| Base de datos de toxicidad en agua de mar | Algas | A (NOEC) | 9 | 1,0000 | 0,00195 | 0,0020 | 0,0020 mg/L Cobre (II) |
| | Crustáceos | A (NOEC) | 1 | 0,1111 | 0,00018 | 0,0000 | |
| | Crustáceos | A (LOEC) | 1 | 0,1111 | 0,00039 | 0,0000 | |
| | N total de datos | | 11 | | | | |
| Base de toxicidad acuática | Algas | A (NOEC) | 9 | 1,0000 | 0,00195 | 0,0020 | 0,0031 mg/L Cobre (II) |
| | Crustáceos | A (NOEC) | 1 | 0,1111 | 0,00018 | 0,00002 | |
| | Crustáceos | A (LOEC) | 1 | 0,1111 | 0,00039 | 0,00004 | |
| | peces | A (NOEC) | 1 | 0,1111 | 0,0013 | 0,0001 | |
| | peces | C (NOEC) | 9 | 1,0000 | 0,0004 | 0,0004 | |
| | peces | A (LOEC) | 1 | 0,0323 | 0,0018 | 0,0001 | |
| | peces | C (LOEC) | 9 | 0,2903 | 0,0013 | 0,0004 | |
| N total de datos | | 31 | | | | | |

ANEXO VII. CADMIO (II)

1. DATOS DE REFERENCIA

1.1. PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS

- Suministro: Panreac
- Nombre del producto: Sulfato de cadmio
- Número del producto:
- Fórmula empírica: CdSO_4
- Peso molecular:
- Apariencia:

1.2. DATOS DE TOXICIDAD DE REFERENCIA

La siguiente tabla muestra algunos resultados de toxicidad obtenidos de la bibliografía:

Tabla A VII.1a.
Datos de toxicidad del Cadmio (II) en algunos grupos de organismos. Algas

| Especies | Medio | Tiempo Exposición (h) | Expresión de toxicidad | Cadmio (II) (mg/L) | Referencia |
|---------------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| <i>Chlorella saccharophyla</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,105 | Moreno Garrido (1997) ⁽¹⁾ |
| <i>Navicula inconsta</i> | Agua dulce | --- | EC50 | 3,008 | Moreno Garrido (1997) ⁽¹⁾ |
| <i>Dunaliella minuta</i> | Agua salada | --- | EC50 | 38,200 | Visviki y Rachlin (1991) |
| <i>Nannochloropsis gaditana</i> | Agua salada | 72 | EC50 | 0,600 | Moreno Garrido (1997) |
| <i>Nitzschia closterium</i> | Agua salada | --- | EC50 | 0,476 | Rachlin <i>et al.</i> (1983) |
| <i>Tetraselmis gracile</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 1,600 | Okamoto <i>et al.</i> (1996) |
| <i>Tetraselmis gracile</i> | Agua salada | 48 | EC50 | 3,200 | Moreno Garrido (1997) ⁽¹⁾ |

Tabla A VII.1b.
Datos de toxicidad del Cadmio (II) en algunos grupos de organismos. Crustáceos

| Especies | Medio | Tiempo Exposición (h) | Expresión de toxicidad | Cadmio (II) (mg/L) | Referencia |
|----------------------------------|-------------|-----------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------------|
| <i>Daphnia pulex</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,006 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia pulex</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 0,042 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia pulex</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 0,063 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Daphnia pulex</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 0,147 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Ceriodaphnia dubia</i> | Agua salada | 48 | EC50 | 0,350 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Ceriodaphnia dubia</i> | Agua salada | 48 | EC50 | 0,560 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Cerodaphnia dubia</i> | Agua salada | 48 | EC50 | 0,120 | Ramamoorthy (1995) ⁽¹⁾ |
| <i>Hydropsyche angustipennis</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 0,100 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Protothaca staminea</i> | Agua salada | 30 d | NOEC | 0,018 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Protothaca staminea</i> | Agua salada | 17 d | EC50 | 0,039 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Protothaca staminea</i> | Agua salada | 30 d | LOEC | 0,039 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Protothaca staminea</i> | Agua salada | 12 d | EC50 | 0,082 | ECETOC ⁽¹⁾ |

Tabla A VII.1c.
Datos de toxicidad del Cadmio (II) en algunos grupos de organismos. Peces

| Especies | Medio | Tiempo Exposición | Expresión de | Cadmio (II) | Referencia |
|------------------------------|------------|-------------------|--------------|-------------|-----------------------|
| <i>Agosia chrysogaster</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,860 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Agosia chrysogaster</i> | Agua dulce | 96 | NOEC | 1,300 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Agosia chrysogaster</i> | Agua dulce | 96 | LOEC | 1,800 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> | Agua dulce | 96 | LOEC | 0,029 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,062 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> | Agua dulce | 72 | EC50 | 0,065 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> | Agua dulce | 72 | EC50 | 0,240 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Cyprinodon variegatus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,265 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Etheostoma flabellare</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,489 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Etheostoma nigrum</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,569 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Ictalurus punctatus</i> | Agua dulce | 30 | NOEC | 0,012 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Ictalurus punctatus</i> | Agua dulce | 60 | NOEC | 0,012 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Ictalurus punctatus</i> | Agua dulce | 30 | LOEC | 0,018 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Ictalurus punctatus</i> | Agua dulce | 60 | LOEC | 0,018 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 28 | EC50 | 0,123 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,250 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 9 | NOEC | 0,338 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 9 | LOEC | 0,620 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 270 | NOEC | 0,019 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 30 | NOEC | 0,044 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 30 | NOEC | 0,072 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 60 | NOEC | 0,072 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 60 | LOEC | 0,119 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 270 | LOEC | 0,119 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,210 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,220 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,270 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales notatus</i> | Agua dulce | 30 | LOEC | 0,718 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 0,140 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,400 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 30 | NOEC | 0,007 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 30 | LOEC | 0,013 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 60 | NOEC | 0,013 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 60 | LOEC | 0,027 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Simocephalus vetulus</i> | Agua dulce | 30 | NOEC | 0,008 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Simocephalus vetulus</i> | Agua dulce | 30 | LOEC | 0,013 | ECETOC ⁽¹⁾ |

¹ Referencias recogidas en los documentos indicados pero no pertenecientes a estos autores

2. ENSAYOS DE MICROALGAS MARINAS

RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Volumen de los viales de ensayo: 15 mL
- Volumen de solución de ensayo: 4 mL
- Agua de dilución: mezcla acetona+agua de mar sintética (acetona al 1,25% (v/v))
- Medio nutriente adicional: si, medio f/2 sin AEDT-Na₂
- Temperatura de ensayo: 20 ± 0,1 °C
- Iluminación: constante, 11000 lux
- Aireación: diaria -de forma manual-
- Duración del ensayo: 10 días (+ 10 para el estudio de la concentración alguistática y alguicida)
- Medidas de biomasa: turbidez, a $\lambda = 690$ nm

MICROALGAS ENSAYADAS

- *Nannochloropsis gaditana*
- *Isochrysis galbana*
- *Dunaliella salina*
- *Chaetoceros gracilis*
- *Tetraselmis chuii*

RESULTADOS OBTENIDOS

- Valores de biomasa (Abs, 690 nm) de cada tratamiento
- Valores experimentales de NOEC y LOEC
- Valores experimentales de inhibición calculados a partir del ICp programa (Las indicaciones inferiores de las tablas (*) y (**)) están referidas a indicaciones realizadas por el programa
- Concentraciones alguistáticas y alguicidas experimentales

2.1. *Nannochloropsis gaditana*

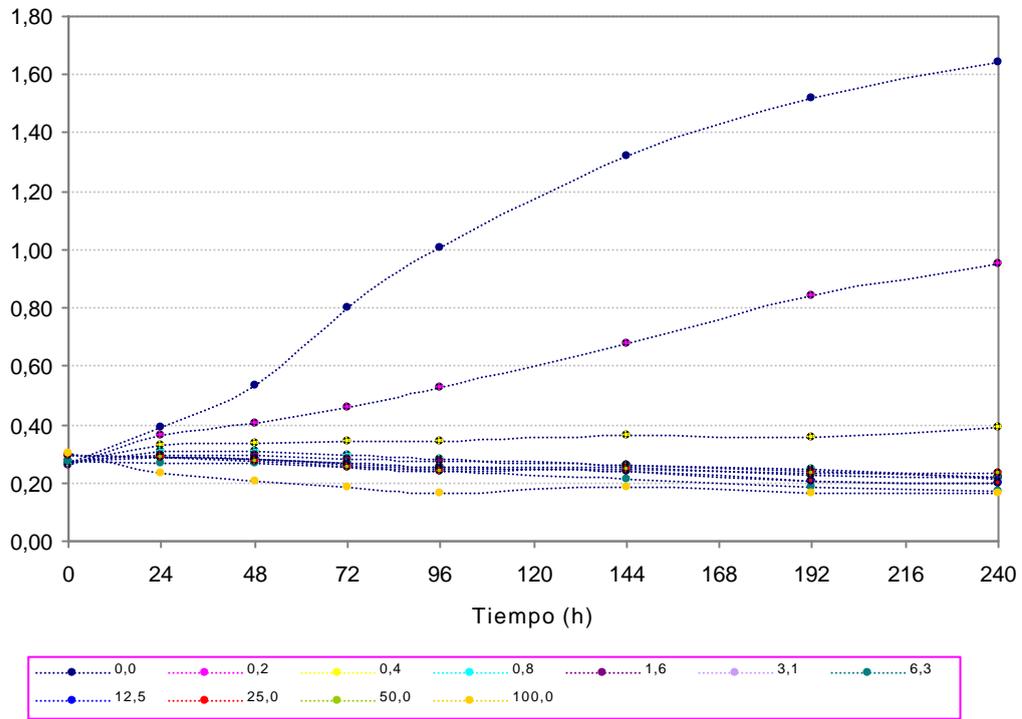
Tabla A VII.2. Evolución de la biomasa de *Nannochloropsis gaditana*. Ensayo de CADMIO (II).

| <i>N. gaditana</i>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | Abs´ = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| 0,0 | 0,271 | 0,407 | 0,550 | 0,815 | 1,016 | | | | 0,000 | 0,136 | 0,279 | 0,544 | 0,745 | | | | |
| | 0,274 | 0,393 | 0,538 | 0,798 | 0,997 | 1,321 | 1,517 | 1,640 | 0,000 | 0,119 | 0,264 | 0,524 | 0,723 | 1,047 | 1,243 | 1,366 | |
| | 0,264 | 0,380 | 0,516 | 0,783 | 0,999 | | | | 0,000 | 0,116 | 0,252 | 0,519 | 0,735 | | | | |
| 0,2 | 0,249 | 0,366 | 0,406 | 0,472 | 0,531 | | | | 0,000 | 0,117 | 0,157 | 0,223 | 0,282 | | | | |
| | 0,257 | 0,360 | 0,397 | 0,461 | 0,527 | 0,680 | 0,840 | 0,949 | 0,000 | 0,103 | 0,140 | 0,204 | 0,270 | 0,423 | 0,583 | 0,692 | |
| | 0,270 | 0,355 | 0,405 | 0,452 | 0,516 | | | | 0,000 | 0,085 | 0,135 | 0,182 | 0,246 | | | | |
| 0,4 | 0,273 | 0,341 | 0,349 | 0,351 | 0,351 | | | | 0,000 | 0,068 | 0,076 | 0,078 | 0,078 | | | | |
| | 0,257 | 0,330 | 0,332 | 0,343 | 0,343 | 0,363 | 0,355 | 0,392 | 0,000 | 0,073 | 0,075 | 0,086 | 0,086 | 0,106 | 0,098 | 0,135 | |
| | 0,264 | 0,323 | 0,331 | 0,331 | 0,340 | | | | 0,000 | 0,059 | 0,067 | 0,067 | 0,076 | | | | |
| 0,8 | 0,282 | 0,318 | 0,312 | 0,298 | 0,282 | | | | 0,000 | 0,036 | 0,030 | 0,016 | 0,000 | | | | |
| | 0,268 | 0,306 | 0,307 | 0,296 | 0,283 | 0,262 | 0,244 | 0,213 | 0,000 | 0,038 | 0,039 | 0,028 | 0,015 | -0,006 | -0,024 | -0,055 | |
| | 0,261 | 0,308 | 0,312 | 0,288 | 0,275 | | | | 0,000 | 0,047 | 0,051 | 0,027 | 0,014 | | | | |
| 1,6 | 0,262 | 0,277 | 0,282 | 0,268 | 0,259 | | | | 0,000 | 0,015 | 0,020 | 0,006 | -0,003 | | | | |
| | 0,285 | 0,310 | 0,302 | 0,289 | 0,288 | 0,258 | 0,237 | 0,217 | 0,000 | 0,025 | 0,017 | 0,004 | 0,003 | -0,027 | -0,048 | -0,068 | |
| | 0,276 | 0,296 | 0,295 | 0,286 | 0,276 | | | | 0,000 | 0,020 | 0,019 | 0,010 | 0,000 | | | | |
| 3,1 | 0,289 | 0,297 | 0,281 | 0,283 | 0,261 | | | | 0,000 | 0,008 | -0,008 | -0,006 | -0,028 | | | | |
| | 0,268 | 0,278 | 0,279 | 0,265 | 0,248 | 0,240 | 0,206 | 0,197 | 0,000 | 0,010 | 0,011 | -0,003 | -0,020 | -0,028 | -0,062 | -0,071 | |
| | 0,272 | 0,279 | 0,274 | 0,263 | 0,250 | | | | 0,000 | 0,007 | 0,002 | -0,009 | -0,022 | | | | |
| 6,3 | 0,284 | 0,281 | 0,277 | 0,262 | 0,246 | | | | 0,000 | -0,003 | -0,007 | -0,022 | -0,038 | | | | |
| | 0,261 | 0,263 | 0,256 | 0,240 | 0,232 | 0,209 | 0,187 | 0,169 | 0,000 | 0,002 | -0,005 | -0,021 | -0,029 | -0,052 | -0,074 | -0,092 | |
| | 0,269 | 0,263 | 0,265 | 0,248 | 0,231 | | | | 0,000 | -0,006 | -0,004 | -0,021 | -0,038 | | | | |
| 12,5 | 0,291 | 0,284 | 0,277 | 0,260 | 0,244 | | | | 0,000 | -0,007 | -0,014 | -0,031 | -0,047 | | | | |
| | 0,301 | 0,297 | 0,288 | 0,273 | 0,263 | 0,253 | 0,228 | 0,220 | 0,000 | -0,004 | -0,013 | -0,028 | -0,038 | -0,048 | -0,073 | -0,081 | |
| | 0,286 | 0,288 | 0,282 | 0,262 | 0,248 | | | | 0,000 | 0,002 | -0,004 | -0,024 | -0,038 | | | | |
| 25,0 | 0,302 | 0,293 | 0,280 | 0,261 | 0,245 | | | | 0,000 | -0,009 | -0,022 | -0,041 | -0,057 | | | | |
| | 0,290 | 0,283 | 0,267 | 0,252 | 0,236 | 0,237 | 0,208 | 0,201 | 0,000 | -0,007 | -0,023 | -0,038 | -0,054 | -0,053 | -0,082 | -0,089 | |
| | 0,296 | 0,289 | 0,286 | 0,264 | 0,253 | | | | 0,000 | -0,007 | -0,010 | -0,032 | -0,043 | | | | |
| 50,0 | 0,278 | 0,271 | 0,250 | 0,232 | 0,221 | | | | 0,000 | -0,007 | -0,028 | -0,046 | -0,057 | | | | |
| | 0,314 | 0,309 | 0,295 | 0,278 | 0,261 | 0,248 | 0,232 | 0,230 | 0,000 | -0,005 | -0,019 | -0,036 | -0,053 | -0,066 | -0,082 | -0,084 | |
| | 0,289 | 0,286 | 0,268 | 0,256 | 0,239 | | | | 0,000 | -0,003 | -0,021 | -0,033 | -0,050 | | | | |
| 100,0 | 0,289 | 0,222 | 0,190 | 0,178 | 0,157 | | | | 0,000 | -0,067 | -0,099 | -0,111 | -0,132 | | | | |
| | 0,314 | 0,247 | 0,214 | 0,207 | 0,173 | 0,184 | 0,166 | 0,163 | 0,000 | -0,067 | -0,100 | -0,107 | -0,141 | -0,130 | -0,148 | -0,151 | |
| | 0,305 | 0,229 | 0,210 | 0,171 | 0,158 | | | | 0,000 | -0,076 | -0,095 | -0,134 | -0,147 | | | | |

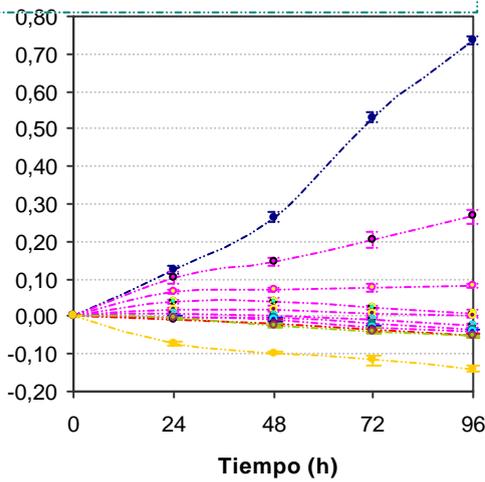
Tabla A VII.3. Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs´)

| t (h) | mg/L CADMIO (II) | | | | | | | | | | | Promedio |
|-------|------------------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|----------|
| | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,1 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | |
| 24 | 0,124 | 0,102 | 0,067 | 0,040 | 0,020 | 0,008 | -0,002 | -0,003 | -0,008 | -0,005 | -0,070 | DesvEst |
| | 0,011 | 0,016 | 0,007 | 0,006 | 0,005 | 0,002 | 0,004 | 0,005 | 0,001 | 0,002 | 0,005 | DesvEst |
| 48 | 0,265 | 0,144 | 0,073 | 0,040 | 0,019 | 0,002 | -0,005 | -0,010 | -0,018 | -0,023 | -0,098 | Promedio |
| | 0,014 | 0,012 | 0,005 | 0,011 | 0,002 | 0,010 | 0,002 | 0,006 | 0,007 | 0,005 | 0,003 | DesvEst |
| 72 | 0,529 | 0,203 | 0,077 | 0,024 | 0,007 | -0,006 | -0,021 | -0,028 | -0,037 | -0,038 | -0,117 | Promedio |
| | 0,013 | 0,021 | 0,010 | 0,007 | 0,003 | 0,003 | 0,001 | 0,004 | 0,005 | 0,007 | 0,015 | DesvEst |
| 96 | 0,734 | 0,266 | 0,080 | 0,010 | 0,000 | -0,023 | -0,035 | -0,041 | -0,051 | -0,053 | -0,140 | Promedio |
| | 0,011 | 0,018 | 0,005 | 0,008 | 0,003 | 0,004 | 0,005 | 0,005 | 0,007 | 0,004 | 0,008 | DesvEst |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

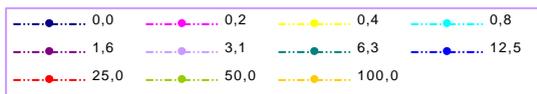
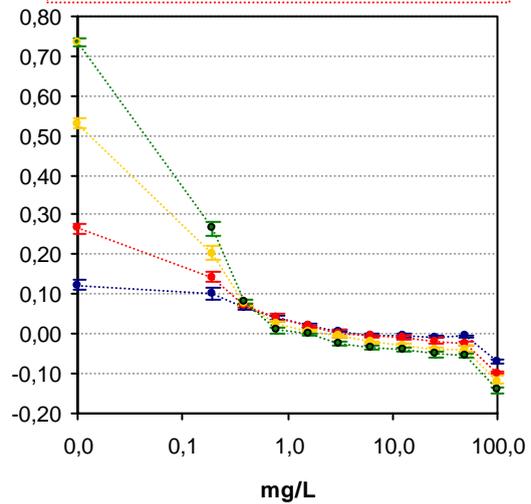


Tabla A VII.4.

Valores de NOEC y LOEC experimentales obtenidos para *N. gaditana* expuesta a diferentes concentraciones de CADMIO (II).

| <i>N. gaditana</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,965 | | 0,970 | | 0,969 | | 0,980 | |
| B calculado | 17,77 | | 14,20 | | 13,31 | | 10,48 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| m/L Cd (II) | t _i | p |
| 0,2 | 3,79(*) | 0,06000 | 19,16 (*) | 0,00015 | 43,83 (*) | 0,00001 | 69,02 (*) | 0,00000 |
| 0,4 | 9,83 | 0,00079 | 30,45 | 0,00001 | 60,76 | 0,00000 | 96,43 | 0,00000 |
| 0,8 | 14,36 | 0,00015 | 35,62 | 0,00001 | 67,80 | 0,00000 | 106,80 | 0,00000 |
| 1,6 | 17,87 | 0,00006 | 39,00 | 0,00000 | 70,08 | 0,00000 | 108,22 | 0,00000 |
| 3,1 | 19,88 | 0,00003 | 41,69 | 0,00001 | 72,10 | 0,00000 | 111,66 | 0,00000 |
| 6,3 | 21,72 | 0,00002 | 42,80 | 0,00000 | 74,16 | 0,00000 | 113,38 | 0,00000 |
| 12,5 | 21,83 | 0,00002 | 43,59 | 0,00000 | 74,66 | 0,00000 | 114,27 | 0,00000 |
| 25,0 | 22,64 | 0,00002 | 44,86 | 0,00000 | 76,09 | 0,00000 | 115,79 | 0,00000 |
| 50,0 | 22,18 | 0,00002 | 45,54 | 0,00000 | 76,27 | 0,00000 | 116,08 | 0,00000 |
| 100,0 | 33,38 | 0,00000 | 57,47 | 0,00000 | 86,04 | 0,00000 | 128,86 | 0,00000 |
| MSD | 0,015 | | 0,017 | | 0,020 | | 0,018 | |
| % reducción | 12,38 | | 6,29 | | 3,71 | | 2,44 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| <i>t=72 h</i> | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,981 | | 0,970 | | 0,972 | | 0,969 | | 0,971 | | 0,969 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 5,31 | | 9,30 | | 10,18 | | 11,52 | | 11,84 | | 13,31 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| m/L Cd (II) | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,2 | 34,73(*) | 0,00 | 37,41(*) | 0,00 | 39,21(*) | 0,00 | 41,07(*) | 0,00 | 42,16(*) | 0,00 | 43,83(*) | 0,00 |
| 0,4 | 48,15 | 0,00 | 51,87 | 0,00 | 54,36 | 0,00 | 56,94 | 0,00 | 58,45 | 0,00 | 60,76 | 0,00 |
| 0,8 | 53,73 | 0,00 | 57,88 | 0,00 | 60,65 | 0,00 | 63,53 | 0,00 | 65,22 | 0,00 | 67,80 | 0,00 |
| 1,6 | 55,54 | 0,00 | 59,83 | 0,00 | 62,70 | 0,00 | 65,68 | 0,00 | 67,42 | 0,00 | 70,08 | 0,00 |
| 3,1 | 57,14 | 0,00 | 61,55 | 0,00 | 64,50 | 0,00 | 67,57 | 0,00 | 69,36 | 0,00 | 72,10 | 0,00 |
| 6,3 | --- | --- | 63,31 | 0,00 | 66,35 | 0,00 | 69,50 | 0,00 | 71,34 | 0,00 | 74,16 | 0,00 |
| 12,5 | --- | --- | --- | --- | 66,79 | 0,00 | 69,96 | 0,00 | 71,81 | 0,00 | 74,66 | 0,00 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 71,30 | 0,00 | 73,19 | 0,00 | 76,09 | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 73,36 | 0,00 | 76,27 | 0,00 |
| 100,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 86,04 | 0,00 |
| MSD | 0,023 | | 0,022 | | 0,021 | | 0,020 | | 0,020 | | 0,020 | |
| % reducción | 4,44 | | 4,17 | | 4,02 | | 3,87 | | 3,80 | | 3,71 | |
| * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | | | | | |

Tabla A VI.5.
Valores de ICp del ensayo de *N. gaditana* y Cd (II) a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de Cd (II) estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,0158 | 0,0140 | 0,0149 | 0,0158 | 0,0169 | 0,0180 | 0,0050 |
| | 25 | 0,0791 | 0,0700 | 0,0748 | 0,0792 | 0,0843 | 0,0900 | 0,0025 |
| | 50 | 0,1582 | 0,1381 | 0,1486 | 0,1582 | 0,1682 | 0,1791 | 0,0050 |
| | 75 | 0,3051 | 0,2703 | 0,2885 | 0,3050 | 0,3197 | 0,3357 | 0,0082 |
| | 95 | 0,7606 | 0,6676 | 0,7163 | 0,7726 | 0,8441 | 0,9359 | 0,9359 |
| 96 | 5 | 0,0153 | 0,0141 | 0,0147 | 0,0153 | 0,0158 | 0,0164 | 0,0003 |
| | 25 | 0,0764 | 0,0703 | 0,0735 | 0,0765 | 0,0791 | 0,0821 | 0,0015 |
| | 50 | 0,1529 | 0,1397 | 0,1466 | 0,1529 | 0,1583 | 0,1642 | 0,0029 |
| | 75 | 0,2818 | 0,2568 | 0,2699 | 0,2818 | 0,2912 | 0,3014 | 0,0054 |
| | 95 | 0,6310 | 0,5740 | 0,6039 | 0,6322 | 0,6558 | 0,6831 | 0,0142 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

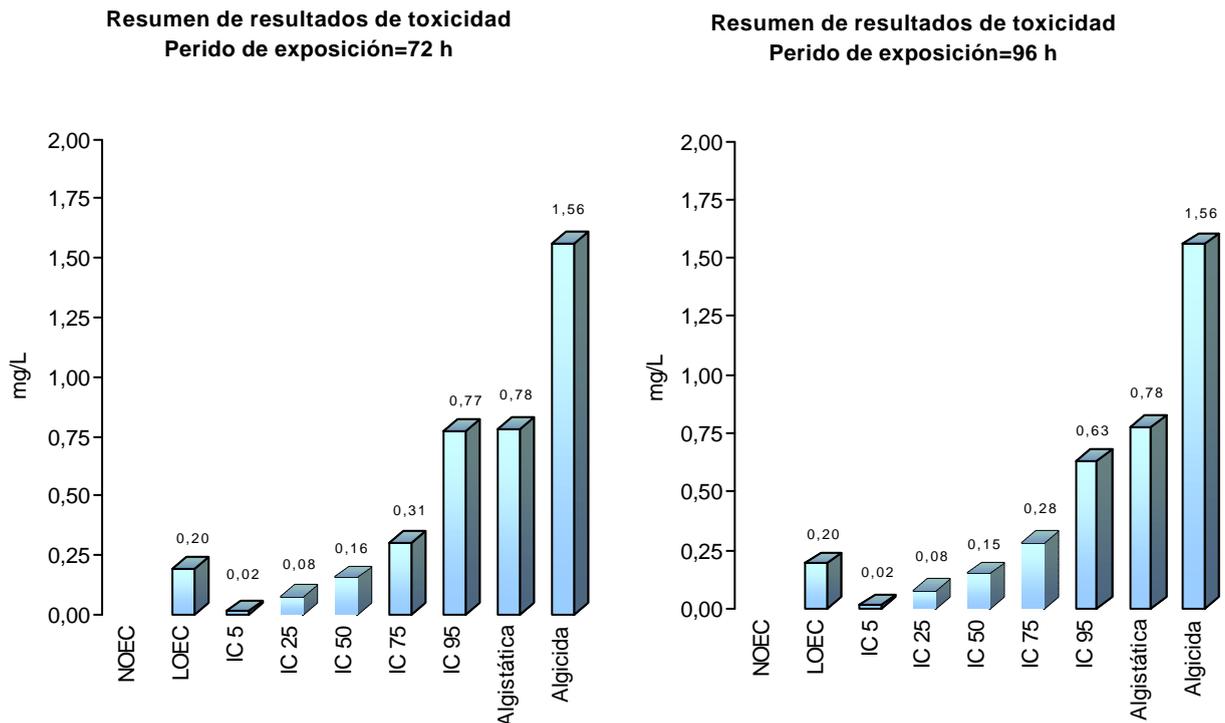
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las ocho concentraciones más altas de Cd (II) ensayadas con *N. gaditana* (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 y 0,78 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo sólo se observó un ligero cambio en la biomasa del vial correspondiente a la concentración de 0,78 mg/L.

- Concentración alguistática= 0,78 mg/L
- Concentración alguicida= 1,56 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del *cadmio* y *N. gaditana*.



2.2. *Isochrysis galbana*

Tabla A VII.6.

Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de CADMIO (II).

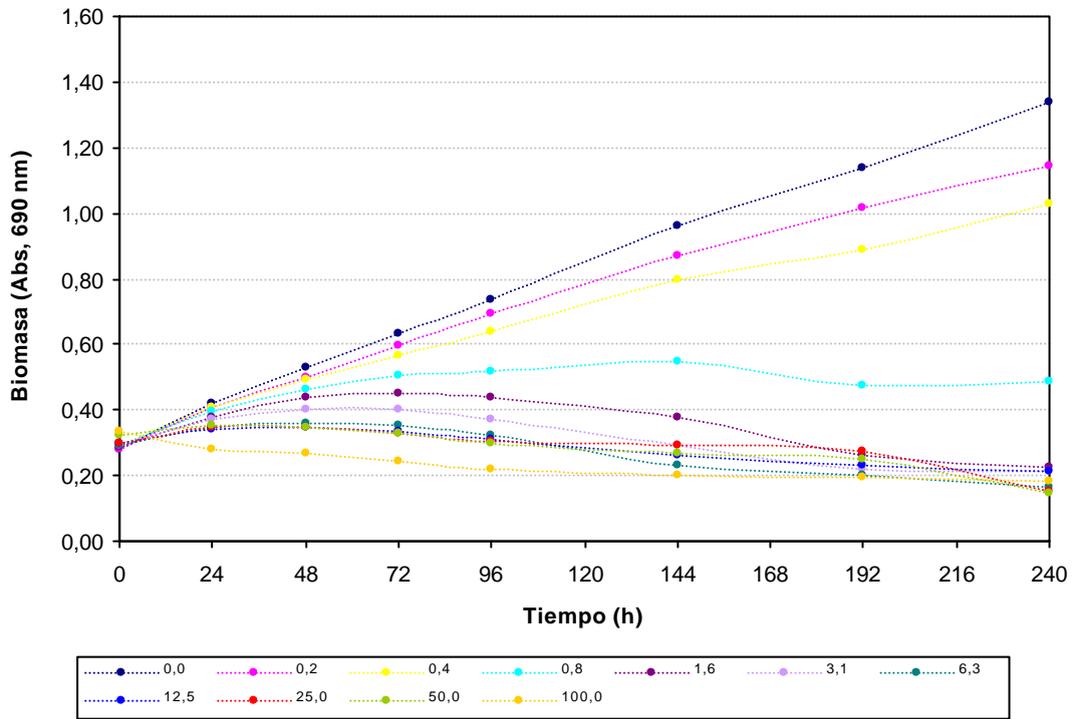
| <i>I. galbana</i>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | Abs´ = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| 0,0 | 0,270 | 0,426 | 0,532 | 0,622 | 0,717 | | | | 0,000 | 0,156 | 0,262 | 0,352 | 0,447 | | | | |
| | 0,290 | 0,419 | 0,533 | 0,639 | 0,747 | 0,961 | 1,140 | 1,341 | 0,000 | 0,129 | 0,243 | 0,349 | 0,457 | 0,671 | 0,850 | 1,051 | |
| | 0,286 | 0,407 | 0,526 | 0,635 | 0,741 | | | | 0,000 | 0,121 | 0,240 | 0,349 | 0,455 | | | | |
| 0,2 | 0,268 | 0,400 | 0,479 | 0,569 | 0,648 | | | | 0,000 | 0,132 | 0,211 | 0,301 | 0,380 | | | | |
| | 0,284 | 0,404 | 0,515 | 0,602 | 0,691 | 0,869 | 1,014 | 1,145 | 0,000 | 0,120 | 0,231 | 0,318 | 0,407 | 0,585 | 0,730 | 0,861 | |
| | 0,295 | 0,412 | 0,495 | 0,624 | 0,733 | | | | 0,000 | 0,117 | 0,200 | 0,329 | 0,438 | | | | |
| 0,4 | 0,280 | 0,404 | 0,480 | 0,545 | 0,611 | | | | 0,000 | 0,124 | 0,200 | 0,265 | 0,331 | | | | |
| | 0,314 | 0,413 | 0,500 | 0,579 | 0,651 | 0,795 | 0,889 | 1,028 | 0,000 | 0,099 | 0,186 | 0,265 | 0,337 | 0,481 | 0,575 | 0,714 | |
| | 0,291 | 0,408 | 0,495 | 0,581 | 0,653 | | | | 0,000 | 0,117 | 0,204 | 0,290 | 0,362 | | | | |
| 0,8 | 0,272 | 0,385 | 0,448 | 0,479 | 0,483 | | | | 0,000 | 0,113 | 0,176 | 0,207 | 0,211 | | | | |
| | 0,306 | 0,405 | 0,469 | 0,513 | 0,524 | 0,548 | 0,473 | 0,486 | 0,000 | 0,099 | 0,163 | 0,207 | 0,218 | 0,242 | 0,167 | 0,180 | |
| | 0,302 | 0,394 | 0,467 | 0,521 | 0,544 | | | | 0,000 | 0,092 | 0,165 | 0,219 | 0,242 | | | | |
| 1,6 | 0,285 | 0,386 | 0,452 | 0,449 | 0,426 | | | | 0,000 | 0,101 | 0,167 | 0,164 | 0,141 | | | | |
| | 0,286 | 0,373 | 0,436 | 0,449 | 0,436 | 0,378 | 0,260 | 0,225 | 0,000 | 0,087 | 0,150 | 0,163 | 0,150 | 0,092 | -0,026 | -0,061 | |
| | 0,279 | 0,373 | 0,430 | 0,456 | 0,450 | | | | 0,000 | 0,094 | 0,151 | 0,177 | 0,171 | | | | |
| 3,1 | 0,278 | 0,359 | 0,377 | 0,372 | 0,341 | | | | 0,000 | 0,081 | 0,099 | 0,094 | 0,063 | | | | |
| | 0,286 | 0,366 | 0,395 | 0,396 | 0,363 | 0,290 | 0,219 | 0,213 | 0,000 | 0,080 | 0,109 | 0,110 | 0,077 | 0,004 | -0,067 | -0,073 | |
| | 0,310 | 0,383 | 0,426 | 0,442 | 0,406 | | | | 0,000 | 0,073 | 0,116 | 0,132 | 0,096 | | | | |
| 6,3 | 0,304 | 0,363 | 0,359 | 0,353 | 0,317 | | | | 0,000 | 0,059 | 0,055 | 0,049 | 0,013 | | | | |
| | 0,278 | 0,338 | 0,345 | 0,339 | 0,307 | 0,230 | 0,198 | 0,166 | 0,000 | 0,060 | 0,067 | 0,061 | 0,029 | -0,048 | -0,080 | -0,112 | |
| | 0,292 | 0,345 | 0,366 | 0,363 | 0,336 | | | | 0,000 | 0,053 | 0,074 | 0,071 | 0,044 | | | | |
| 12,5 | 0,306 | 0,355 | 0,353 | 0,340 | 0,309 | | | | 0,000 | 0,049 | 0,047 | 0,034 | 0,003 | | | | |
| | 0,303 | 0,344 | 0,345 | 0,335 | 0,310 | 0,260 | 0,234 | 0,214 | 0,000 | 0,041 | 0,042 | 0,032 | 0,007 | -0,043 | -0,069 | -0,089 | |
| | 0,282 | 0,326 | 0,344 | 0,322 | 0,309 | | | | 0,000 | 0,044 | 0,062 | 0,040 | 0,027 | | | | |
| 25,0 | 0,297 | 0,346 | 0,353 | 0,322 | 0,299 | | | | 0,000 | 0,049 | 0,056 | 0,025 | 0,002 | | | | |
| | 0,316 | 0,356 | 0,359 | 0,346 | 0,323 | 0,289 | 0,275 | 0,154 | 0,000 | 0,040 | 0,043 | 0,030 | 0,007 | -0,027 | -0,041 | -0,162 | |
| | 0,289 | 0,330 | 0,330 | 0,324 | 0,294 | | | | 0,000 | 0,041 | 0,041 | 0,035 | 0,005 | | | | |
| 50,0 | 0,323 | 0,364 | 0,355 | 0,330 | 0,295 | | | | 0,000 | 0,041 | 0,032 | 0,007 | -0,028 | | | | |
| | 0,315 | 0,341 | 0,340 | 0,325 | 0,292 | 0,265 | 0,247 | 0,148 | 0,000 | 0,026 | 0,025 | 0,010 | -0,023 | -0,050 | -0,068 | -0,167 | |
| | 0,324 | 0,355 | 0,346 | 0,328 | 0,303 | | | | 0,000 | 0,031 | 0,022 | 0,004 | -0,021 | | | | |
| 100,0 | 0,339 | 0,291 | 0,279 | 0,244 | 0,222 | | | | 0,000 | -0,048 | -0,060 | -0,095 | -0,117 | | | | |
| | 0,322 | 0,259 | 0,245 | 0,227 | 0,203 | 0,202 | 0,194 | 0,185 | 0,000 | -0,063 | -0,077 | -0,095 | -0,119 | -0,120 | -0,128 | -0,137 | |
| | 0,345 | 0,288 | 0,275 | 0,256 | 0,232 | | | | 0,000 | -0,057 | -0,070 | -0,089 | -0,113 | | | | |

Tabla A VII.7.

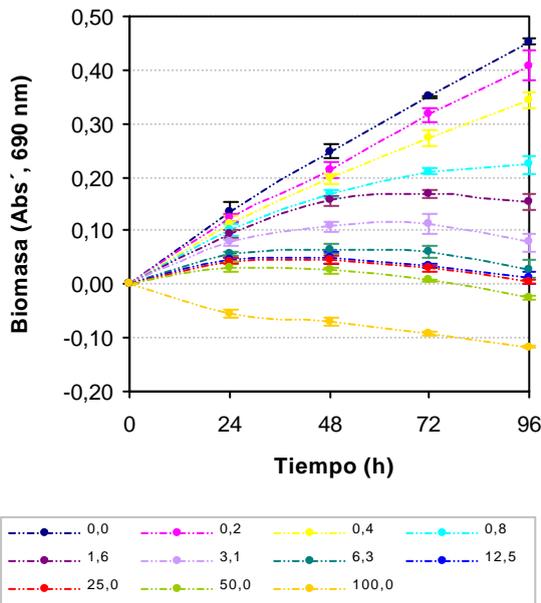
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs´)

| t (h) | mg/L CADMIO (II) | | | | | | | | | | | Promedio | DesvEst |
|-------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|----------|---------|
| | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,1 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | | |
| 24 | 0,135 | 0,123 | 0,113 | 0,101 | 0,094 | 0,078 | 0,057 | 0,045 | 0,043 | 0,033 | -0,056 | Promedio | DesvEst |
| | 0,018 | 0,008 | 0,013 | 0,011 | 0,007 | 0,004 | 0,004 | 0,004 | 0,005 | 0,008 | 0,008 | | |
| 48 | 0,248 | 0,214 | 0,197 | 0,168 | 0,156 | 0,108 | 0,065 | 0,050 | 0,047 | 0,026 | -0,069 | Promedio | DesvEst |
| | 0,012 | 0,016 | 0,009 | 0,007 | 0,010 | 0,009 | 0,010 | 0,010 | 0,008 | 0,005 | 0,009 | | |
| 72 | 0,350 | 0,316 | 0,273 | 0,211 | 0,168 | 0,112 | 0,060 | 0,035 | 0,030 | 0,007 | -0,093 | Promedio | DesvEst |
| | 0,002 | 0,014 | 0,014 | 0,007 | 0,008 | 0,019 | 0,011 | 0,004 | 0,005 | 0,003 | 0,003 | | |
| 96 | 0,453 | 0,408 | 0,343 | 0,224 | 0,154 | 0,079 | 0,029 | 0,012 | 0,005 | -0,024 | -0,116 | Promedio | DesvEst |
| | 0,005 | 0,029 | 0,016 | 0,016 | 0,015 | 0,017 | 0,016 | 0,013 | 0,003 | 0,004 | 0,003 | | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

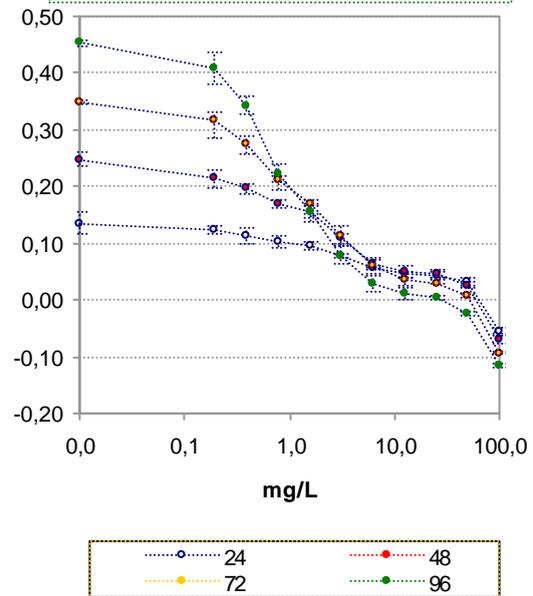


Tabla A VII.8.

Valores de NOEC y LOEC experimentales obtenidos para *L. galbana* expuesta a diferentes concentraciones de CADMIO (II).

| <i>L. galbana</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,977 | | 0,946 | | 0,970 | | 0,960 | |
| B calculado | 8,91 | | 2,72 | | 15,52 | | 15,99 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| m/L Cd (II) | t _i | p |
| 0,2 | 1,65 | 0,17265 | 4,29 (*) | 0,01970 | 4,23 (*) | 0,36901 | 3,74 (*) | 0,02933 |
| 0,4 | 2,95 (*) | 0,08222 | 6,45 | 0,00209 | 9,53 | 0,44547 | 9,19 | 0,00019 |
| 0,8 | 4,56 | 0,02506 | 10,03 | 0,00027 | 17,28 | 0,47480 | 19,21 | 0,00001 |
| 1,6 | 5,54 | 0,01091 | 11,53 | 0,00024 | 22,62 | 0,35211 | 25,05 | 0,00000 |
| 3,1 | 7,69 | 0,00311 | 17,53 | 0,00004 | 29,58 | 0,28660 | 31,36 | 0,00000 |
| 6,3 | 10,46 | 0,00098 | 22,85 | 0,00002 | 36,00 | 0,18445 | 35,55 | 0,00000 |
| 12,5 | 12,15 | 0,00056 | 24,73 | 0,00001 | 39,11 | 0,15248 | 36,92 | 0,00000 |
| 25,0 | 12,33 | 0,00055 | 25,18 | 0,00001 | 39,77 | 0,02038 | 37,56 | 0,00000 |
| 50,0 | 13,76 | 0,00043 | 27,72 | 0,00000 | 42,63 | 0,00423 | 39,96 | 0,00000 |
| 100,0 | 25,65 | 0,00004 | 39,63 | 0,00000 | 55,06 | 0,00056 | 47,70 | 0,00000 |
| MSD | 0,020 | | 0,021 | | 0,021 | | 0,032 | |
| % reducción | 14,55 | | 8,51 | | 6,07 | | 6,96 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,964 | | 0,975 | | 0,976 | | 0,978 | | 0,975 | | 0,970 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 15,52 | |
| B calculado | 7,29 | | 7,32 | | 9,33 | | 10,71 | | 13,40 | | 8,84 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| m/L Cd (II) | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,2 | 3,43(*) | 0,01 | 3,48(*) | 0,01 | 3,68(*) | 0,01 | 3,86(*) | 0,01 | 4,05(*) | 0,01 | 4,23(*) | 0,01 |
| 0,4 | 7,74 | 0,00 | 7,84 | 0,00 | 8,31 | 0,00 | 8,71 | 0,00 | 9,14 | 0,00 | 9,53 | 0,00 |
| 0,8 | 14,03 | 0,00 | 14,21 | 0,00 | 15,06 | 0,00 | 15,78 | 0,00 | 16,57 | 0,00 | 17,28 | 0,00 |
| 1,6 | 18,37 | 0,00 | 18,61 | 0,00 | 19,72 | 0,00 | 20,67 | 0,00 | 21,69 | 0,00 | 22,62 | 0,00 |
| 3,1 | 24,02 | 0,00 | 24,33 | 0,00 | 25,79 | 0,00 | 27,03 | 0,00 | 28,37 | 0,00 | 29,58 | 0,00 |
| 6,3 | --- | --- | 29,61 | 0,00 | 31,39 | 0,00 | 32,89 | 0,00 | 34,52 | 0,00 | 36,00 | 0,00 |
| 12,5 | --- | --- | --- | --- | 34,10 | 0,00 | 35,73 | 0,00 | 37,50 | 0,00 | 39,11 | 0,00 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 36,34 | 0,00 | 38,14 | 0,00 | 39,77 | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 40,88 | 0,00 | 42,63 | 0,00 |
| 100,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 55,06 | 0,00 |
| MSD | 0,025 | | 0,025 | | 0,024 | | 0,023 | | 0,022 | | 0,021 | |
| % reducción | 7,08 | | 7,07 | | 6,75 | | 6,49 | | 6,23 | | 6,07 | |
| * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | | | | | |

Tabla A VI.9.
Valores de ICp del ensayo de *I. galbana* y Cd (II) a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de Cd (II) estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,1004 | 0,0385 | 0,0709 | 0,1045 | 0,1625 | 0,2308 | 0,0225 |
| | 25 | 0,4588 | 0,3412 | 0,4028 | 0,4558 | 0,5268 | 0,6015 | 0,0360 |
| | 50 | 1,4357 | 1,2638 | 1,3539 | 1,4430 | 1,6074 | 1,7963 | 0,0619 |
| | 75 | 4,6069 | 2,7876 | 3,7405 | 4,5669 | 5,1686 | 2,7864 | 0,3459 |
| | 95 | 38,5870 | 32,1447 | 35,5192 | 38,4432 | 41,2158 | 44,1074 | 44,1074 |
| 96 | 5 | 0,0989 | 0,0183 | 0,0605 | 0,1088 | 0,2066 | 0,3250 | 0,0390 |
| | 25 | 0,4027 | 0,3244 | 0,3654 | 0,4035 | 0,4516 | 0,5054 | 0,0231 |
| | 50 | 0,7718 | 0,6932 | 0,7343 | 0,7854 | 0,9113 | 1,0649 | 0,0466 |
| | 75 | 2,4079 | 1,9621 | 2,1956 | 2,4135 | 2,6540 | 2,9247 | 0,1145 |
| | 95 | 8,5523 | 3,0833 | 5,9480 | 8,5569 | 13,9329 | 19,8516 | 1,9840 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

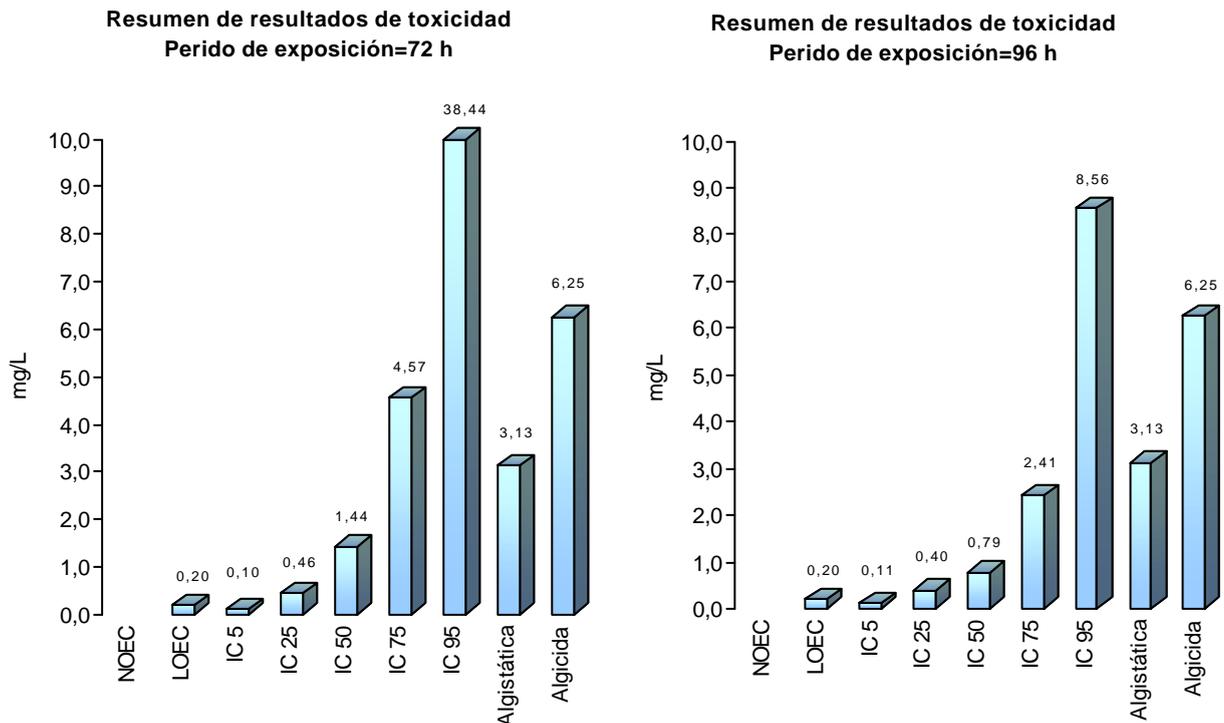
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las concentraciones más altas de Cd (II) ensayadas con *I. galbana* (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 y 0,78 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo se observó un aumento de biomasa a partir de las concentraciones de 3,13 mg/L, por tanto:

- Concentración alguistática= 3,13 mg/L
- Concentración alguicida= 6,25 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del cadmio y *I. galbana*.



2.3. *Dunaliella salina*

Tabla A VII.10.

Evolución de la biomasa de *Dunaliella salina*. Ensayo de CADMIO (II).

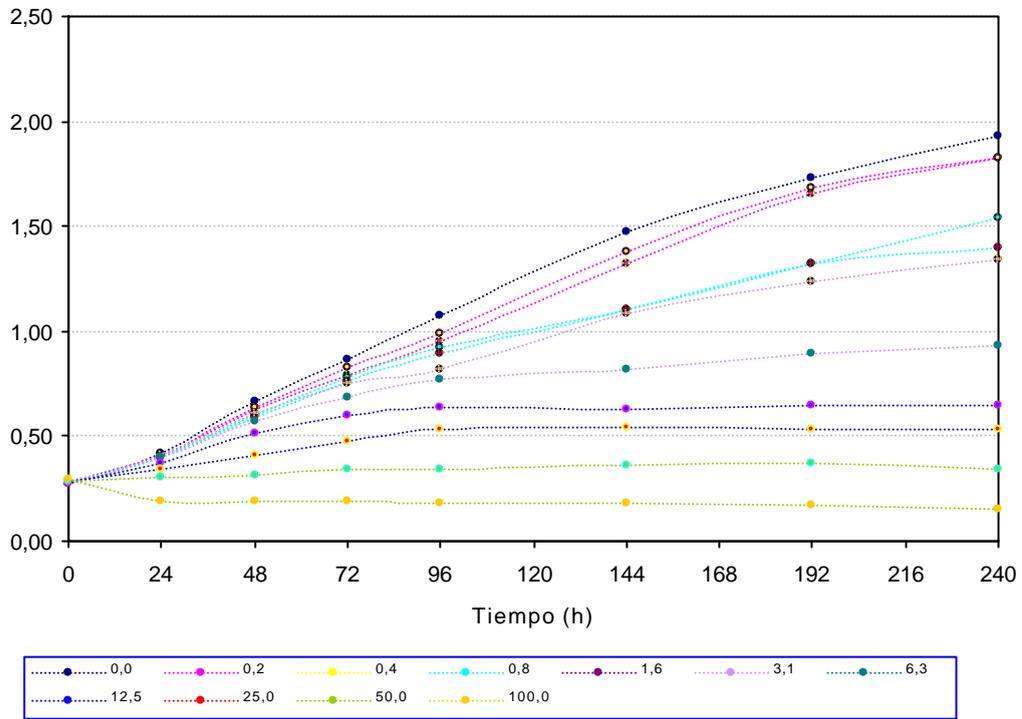
| <i>D. salina</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| 0,0 | 0,265 | 0,421 | 0,692 | 0,902 | 1,118 | | | | 0,000 | 0,156 | 0,427 | 0,637 | 0,853 | | | | |
| | 0,289 | 0,416 | 0,672 | 0,888 | 1,096 | 1,477 | 1,732 | 1,930 | 0,000 | 0,127 | 0,383 | 0,599 | 0,807 | 1,188 | 1,443 | 1,641 | |
| | 0,274 | 0,404 | 0,628 | 0,810 | 0,995 | | | | 0,000 | 0,130 | 0,354 | 0,536 | 0,721 | | | | |
| 0,2 | 0,261 | 0,410 | 0,645 | 0,816 | 0,997 | | | | 0,000 | 0,149 | 0,384 | 0,555 | 0,736 | | | | |
| | 0,286 | 0,422 | 0,639 | 0,825 | 0,989 | 1,317 | 1,653 | 1,823 | 0,000 | 0,136 | 0,353 | 0,539 | 0,703 | 1,031 | 1,367 | 1,537 | |
| | 0,278 | 0,393 | 0,586 | 0,728 | 0,875 | | | | 0,000 | 0,115 | 0,308 | 0,450 | 0,597 | | | | |
| 0,4 | 0,283 | 0,420 | 0,671 | 0,882 | 1,048 | | | | 0,000 | 0,137 | 0,388 | 0,599 | 0,765 | | | | |
| | 0,289 | 0,422 | 0,651 | 0,858 | 1,021 | 1,379 | 1,683 | 1,824 | 0,000 | 0,133 | 0,362 | 0,569 | 0,732 | 1,090 | 1,394 | 1,535 | |
| | 0,267 | 0,381 | 0,585 | 0,745 | 0,883 | | | | 0,000 | 0,114 | 0,318 | 0,478 | 0,616 | | | | |
| 0,8 | 0,289 | 0,423 | 0,663 | 0,864 | 1,028 | | | | 0,000 | 0,134 | 0,374 | 0,575 | 0,739 | | | | |
| | 0,266 | 0,389 | 0,572 | 0,732 | 0,865 | 1,106 | 1,322 | 1,538 | 0,000 | 0,123 | 0,306 | 0,466 | 0,599 | 0,840 | 1,056 | 1,272 | |
| | 0,265 | 0,377 | 0,555 | 0,730 | 0,863 | | | | 0,000 | 0,112 | 0,290 | 0,465 | 0,598 | | | | |
| 1,6 | 0,272 | 0,406 | 0,622 | 0,804 | 0,953 | | | | 0,000 | 0,134 | 0,350 | 0,532 | 0,681 | | | | |
| | 0,264 | 0,387 | 0,582 | 0,744 | 0,865 | 1,106 | 1,320 | 1,400 | 0,000 | 0,123 | 0,318 | 0,480 | 0,601 | 0,842 | 1,056 | 1,136 | |
| | 0,295 | 0,404 | 0,569 | 0,727 | 0,873 | | | | 0,000 | 0,109 | 0,274 | 0,432 | 0,578 | | | | |
| 3,1 | 0,290 | 0,425 | 0,625 | 0,757 | 0,813 | | | | 0,000 | 0,135 | 0,335 | 0,467 | 0,523 | | | | |
| | 0,291 | 0,418 | 0,627 | 0,807 | 0,900 | 1,086 | 1,232 | 1,338 | 0,000 | 0,127 | 0,336 | 0,516 | 0,609 | 0,795 | 0,941 | 1,047 | |
| | 0,280 | 0,377 | 0,575 | 0,701 | 0,746 | | | | 0,000 | 0,097 | 0,295 | 0,421 | 0,466 | | | | |
| 6,3 | 0,270 | 0,411 | 0,581 | 0,692 | 0,760 | | | | 0,000 | 0,141 | 0,311 | 0,422 | 0,490 | | | | |
| | 0,261 | 0,382 | 0,537 | 0,626 | 0,760 | 0,817 | 0,889 | 0,929 | 0,000 | 0,121 | 0,276 | 0,365 | 0,499 | 0,556 | 0,628 | 0,668 | |
| | 0,285 | 0,404 | 0,600 | 0,739 | 0,804 | | | | 0,000 | 0,119 | 0,315 | 0,454 | 0,519 | | | | |
| 12,5 | 0,282 | 0,369 | 0,492 | 0,589 | 0,633 | | | | 0,000 | 0,087 | 0,210 | 0,307 | 0,351 | | | | |
| | 0,284 | 0,387 | 0,540 | 0,626 | 0,651 | 0,627 | 0,650 | 0,650 | 0,000 | 0,103 | 0,256 | 0,342 | 0,367 | 0,343 | 0,366 | 0,366 | |
| | 0,261 | 0,368 | 0,509 | 0,586 | 0,633 | | | | 0,000 | 0,107 | 0,248 | 0,325 | 0,372 | | | | |
| 25,0 | 0,295 | 0,342 | 0,408 | 0,484 | 0,530 | | | | 0,000 | 0,047 | 0,113 | 0,189 | 0,235 | | | | |
| | 0,272 | 0,328 | 0,396 | 0,460 | 0,520 | 0,539 | 0,537 | 0,536 | 0,000 | 0,056 | 0,124 | 0,188 | 0,248 | 0,267 | 0,265 | 0,264 | |
| | 0,290 | 0,352 | 0,409 | 0,489 | 0,561 | | | | 0,000 | 0,062 | 0,119 | 0,199 | 0,271 | | | | |
| 50,0 | 0,288 | 0,300 | 0,329 | 0,344 | 0,312 | | | | 0,000 | 0,012 | 0,041 | 0,056 | 0,024 | | | | |
| | 0,278 | 0,310 | 0,325 | 0,353 | 0,373 | 0,364 | 0,370 | 0,342 | 0,000 | 0,032 | 0,047 | 0,075 | 0,095 | 0,086 | 0,092 | 0,064 | |
| | 0,284 | 0,294 | 0,294 | 0,316 | 0,339 | | | | 0,000 | 0,010 | 0,010 | 0,032 | 0,055 | | | | |
| 100,0 | 0,305 | 0,205 | 0,197 | 0,198 | 0,206 | | | | 0,000 | -0,100 | -0,108 | -0,107 | -0,099 | | | | |
| | 0,285 | 0,181 | 0,186 | 0,182 | 0,169 | 0,181 | 0,174 | 0,149 | 0,000 | -0,104 | -0,099 | -0,103 | -0,116 | -0,104 | -0,111 | -0,136 | |
| | 0,284 | 0,177 | 0,201 | 0,197 | 0,178 | | | | 0,000 | -0,107 | -0,083 | -0,087 | -0,106 | | | | |

Tabla A VII.11.

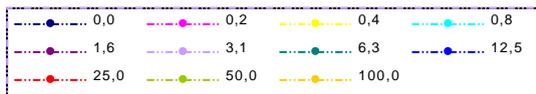
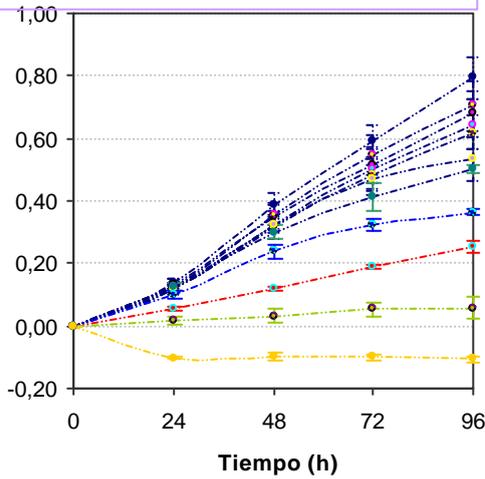
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs')

| t (h) | mg/L CADMIO (II) | | | | | | | | | | | Promedio |
|-----------|------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|----------|
| | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,1 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | |
| 24 | 0,138 | 0,133 | 0,128 | 0,123 | 0,122 | 0,120 | 0,127 | 0,099 | 0,055 | 0,018 | -0,104 | DesvEst |
| | 0,016 | 0,017 | 0,012 | 0,011 | 0,013 | 0,020 | 0,012 | 0,011 | 0,008 | 0,012 | 0,004 | |
| 48 | 0,388 | 0,348 | 0,356 | 0,323 | 0,314 | 0,322 | 0,301 | 0,238 | 0,119 | 0,033 | -0,097 | DesvEst |
| | 0,037 | 0,038 | 0,035 | 0,045 | 0,038 | 0,023 | 0,021 | 0,025 | 0,006 | 0,020 | 0,013 | |
| 72 | 0,591 | 0,515 | 0,549 | 0,502 | 0,481 | 0,468 | 0,414 | 0,325 | 0,192 | 0,054 | -0,099 | DesvEst |
| | 0,051 | 0,057 | 0,063 | 0,063 | 0,050 | 0,048 | 0,045 | 0,018 | 0,006 | 0,022 | 0,011 | |
| 96 | 0,794 | 0,679 | 0,704 | 0,645 | 0,620 | 0,533 | 0,503 | 0,363 | 0,251 | 0,058 | -0,107 | DesvEst |
| | 0,067 | 0,073 | 0,078 | 0,081 | 0,054 | 0,072 | 0,015 | 0,011 | 0,018 | 0,036 | 0,009 | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

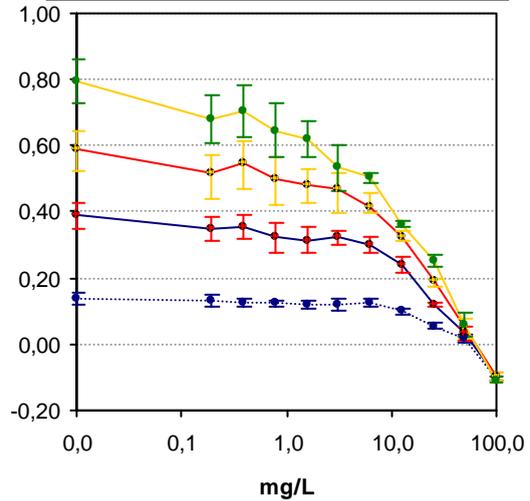


Tabla A VII.12.

Valores de NOEC y LOEC experimentales obtenidos para *D. salina* expuesta a diferentes concentraciones de CADMIO (II).

| <i>D. salina</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,967 | | 0,954 | | 0,967 | | 0,975 | |
| B calculado | 5,17 | | 8,11 | | 12,65 | | 16,04 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| m/L Cd (II) | t _i | p |
| 0,2 | 0,41 | 0,38234 | 1,64 | 0,13238 | 2,11 | 0,07952 | 2,59 | 0,05702 |
| 0,4 | 0,91 | 0,22619 | 1,32 | 0,16920 | 1,16 | 0,21014 | 2,01 | 0,10377 |
| 0,8 | 1,38 | 0,12999 | 2,67 | 0,06233 | 2,46 | 0,06584 | 3,34 (*) | 0,03553 |
| 1,6 | 1,48 | 0,12596 | 3,05 | 0,03641 | 3,03 (*) | 0,02847 | 3,91 | 0,01252 |
| 3,1 | 1,70 | 0,14515 | 2,72 (*) | 0,02928 | 3,40 | 0,01905 | 5,87 | 0,00503 |
| 6,3 | 1,01 | 0,20457 | 3,60 | 0,01185 | 4,91 | 0,00540 | 6,55 | 0,00092 |
| 12,5 | 3,65 (*) | 0,01246 | 6,18 | 0,00210 | 7,37 | 0,00052 | 9,68 | 0,00020 |
| 25,0 | 7,79 | 0,00063 | 11,11 | 0,00012 | 11,05 | 0,00009 | 12,20 | 0,00009 |
| 50,0 | 11,28 | 0,00025 | 14,65 | 0,00006 | 14,86 | 0,00004 | 16,55 | 0,00004 |
| 100,0 | 22,75 | 0,00001 | 19,98 | 0,00001 | 19,11 | 0,00001 | 20,27 | 0,00001 |
| MSD | 0,028 | | 0,064 | | 0,095 | | 0,117 | |
| % reducción | 20,34 | | 16,50 | | 16,13 | | 14,78 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,920 | | 0,920 | | 0,942 | | 0,954 | | 0,962 | | 0,967 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 0,25 | | 0,37 | | 2,57 | | 8,02 | | 9,34 | | 12,65 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| m/L Cd (II) | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0.2 | 1,68 | 0,08 | 1,72 | 0,08 | 1,82 | 0,08 | 1,93 | 0,08 | 2,01 | 0,08 | 2,11 | 0,08 |
| 0.4 | 0,93 | 0,21 | 0,95 | 0,21 | 1,01 | 0,21 | 1,07 | 0,21 | 1,11 | 0,21 | 1,16 | 0,21 |
| 0.8 | 1,95 | 0,07 | 2,00 | 0,07 | 2,13 | 0,07 | 2,25 | 0,07 | 2,35 | 0,07 | 2,46 | 0,07 |
| 1.6 | 2,41 | 0,03 | 2,47 | 0,03 | 2,62(*) | 0,03 | 2,78(*) | 0,03 | 2,90(*) | 0,03 | 3,03(*) | 0,03 |
| 3.1 | 2,70(*) | 0,02 | 2,77(*) | 0,02 | 2,94 | 0,02 | 3,12 | 0,02 | 3,25 | 0,02 | 3,40 | 0,02 |
| 6.3 | --- | --- | 4,00 | 0,01 | 4,24 | 0,01 | 4,50 | 0,01 | 4,69 | 0,01 | 4,91 | 0,01 |
| 12.5 | --- | --- | --- | --- | 6,38 | 0,00 | 6,76 | 0,00 | 7,05 | 0,00 | 7,37 | 0,00 |
| 25.0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 10,13 | 0,00 | 10,56 | 0,00 | 11,05 | 0,00 |
| 50.0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 14,21 | 0,00 | 14,86 | 0,00 |
| 100.0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 19,11 | 0,00 |
| MSD | 0,113 | | 0,112 | | 0,107 | | 0,102 | | 0,098 | | 0,095 | |
| % reducción | 19,20 | | 18,95 | | 18,07 | | 17,19 | | 16,61 | | 16,13 | |
| * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | | | | | |

Tabla A VI.13.
Valores de ICp del ensayo de *D. salina* y Cd (II) a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de Cd (II) estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,0976 | 0,0052 | 0,0536 | 0,1959 | 0,8824 | 1,7456 | 0,2340 |
| | 25 | 4,5629 | -2,1260 | 1,3777 | 4,4079 | 7,5752 | 10,8887 | 1,6452 |
| | 50 | 15,2638 | 9,5692 | 12,5521 | 15,2250 | 17,5197 | 20,0011 | 1,2759 |
| | 75 | 33,0508 | 28,0377 | 30,6636 | 33,0316 | 35,6412 | 38,4907 | 1,2890 |
| | 95 | 72,8221 | 38,5129 | 56,4844 | 71,9662 | 80,3111 | 88,5490 | 88,5490 |
| 96 | 5 | 0,0757 | 0,0169 | 0,0477 | 0,1189 | 0,5045 | 0,9762 | 0,1277 |
| | 25 | 2,0057 | -0,8064 | 0,6666 | 2,0042 | 3,8666 | 5,9137 | 0,7859 |
| | 50 | 10,9973 | 8,0160 | 9,5776 | 10,9710 | 12,3793 | 13,8996 | 0,7772 |
| | 75 | 31,8427 | 25,6588 | 28,8980 | 31,8845 | 34,7948 | 38,0421 | 1,4524 |
| | 95 | 65,7902 | 29,0089 | 48,2753 | 64,2758 | 78,7105 | 92,9229 | 9,2957 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

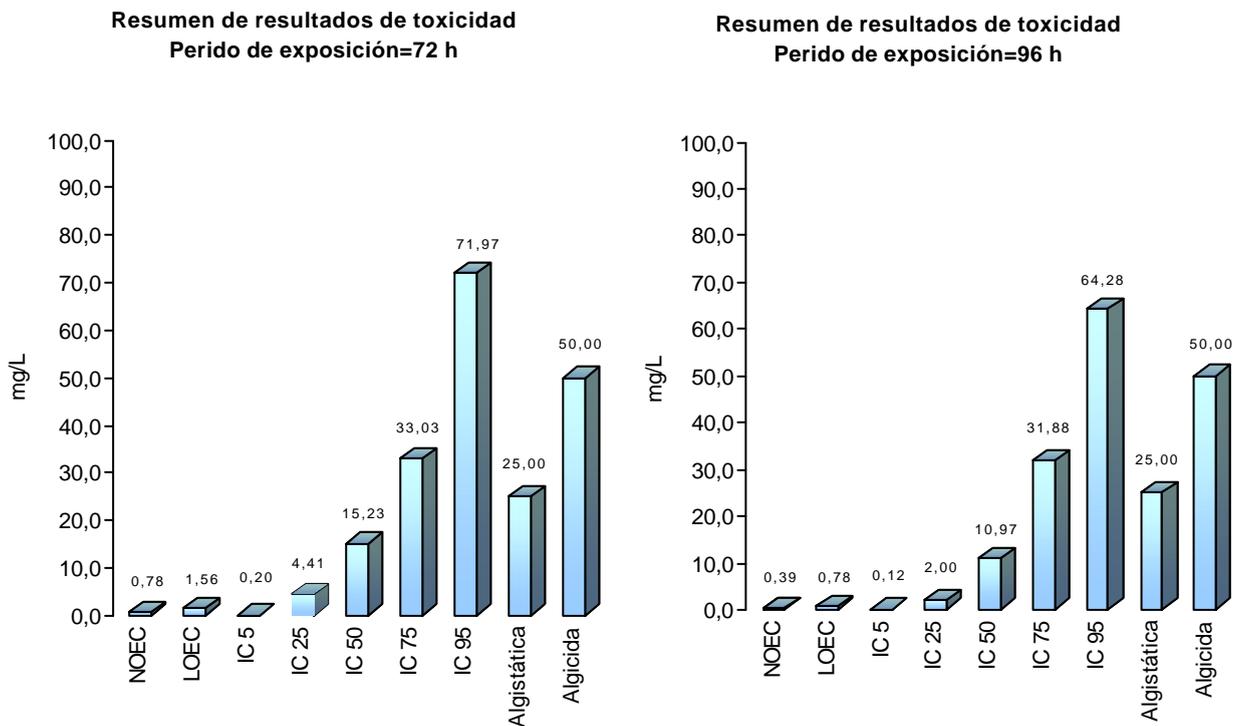
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las concentraciones más altas de Cd (II) ensayadas con *D. salina* (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 y 0,78 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo se observó cambios en la biomasa de los viales que estudian la concentración alguistática y algucida de las concentraciones de 25 mg/L e inferiores.

- Concentración alguistática= 25 mg/L
- Concentración algucida= 50 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del *cadmio* y *D.salina*.



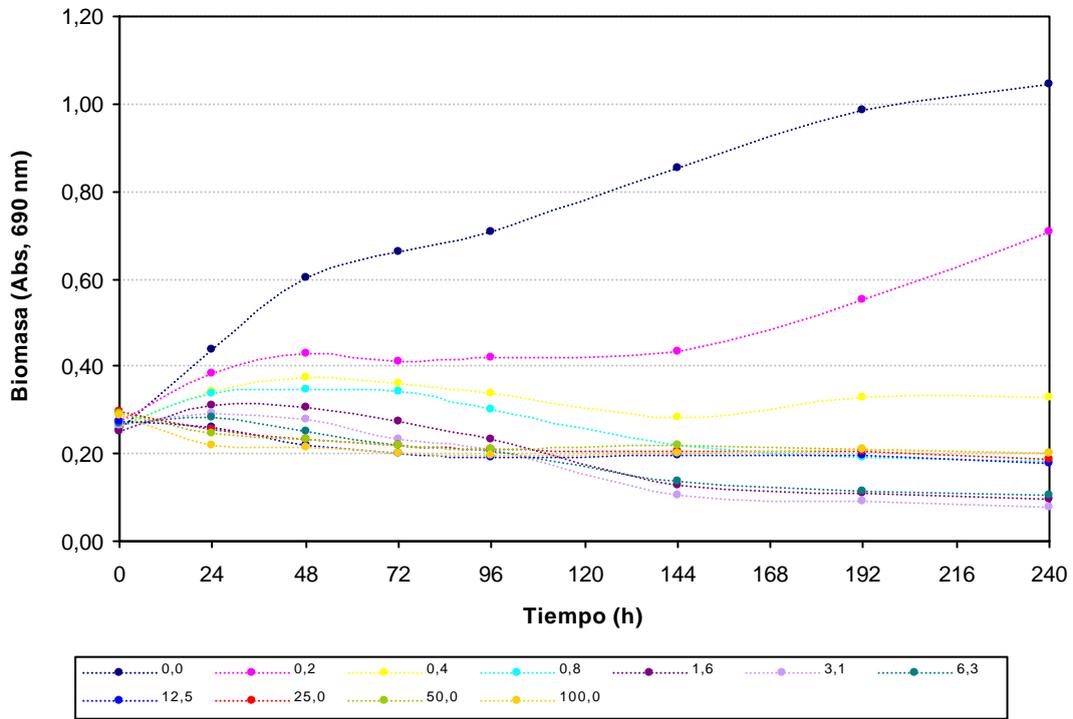
2.4. Chaetoceros gracilis**Tabla A VII.14.****Evolución de la biomasa de *Chaetoceros gracilis*. Ensayo de CADMIO (II).**

| C. gracilis. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | Abs´ = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| 0,0 | 0,252 | 0,451 | 0,601 | 0,660 | 0,719 | | | | 0,000 | 0,199 | 0,349 | 0,408 | 0,467 | | | | |
| | 0,271 | 0,449 | 0,623 | 0,686 | 0,720 | 0,853 | 0,984 | 1,047 | 0,000 | 0,178 | 0,352 | 0,415 | 0,449 | 0,582 | 0,713 | 0,776 | |
| | 0,247 | 0,413 | 0,587 | 0,634 | 0,680 | | | | 0,000 | 0,166 | 0,340 | 0,387 | 0,433 | | | | |
| 0,2 | 0,285 | 0,412 | 0,428 | 0,418 | 0,425 | | | | 0,000 | 0,127 | 0,143 | 0,133 | 0,140 | | | | |
| | 0,269 | 0,376 | 0,429 | 0,406 | 0,413 | 0,433 | 0,550 | 0,709 | 0,000 | 0,107 | 0,160 | 0,137 | 0,144 | 0,164 | 0,281 | 0,440 | |
| | 0,264 | 0,368 | 0,431 | 0,412 | 0,419 | | | | 0,000 | 0,104 | 0,167 | 0,148 | 0,155 | | | | |
| 0,4 | 0,271 | 0,364 | 0,391 | 0,379 | 0,369 | | | | 0,000 | 0,093 | 0,120 | 0,108 | 0,098 | | | | |
| | 0,251 | 0,336 | 0,358 | 0,345 | 0,321 | 0,285 | 0,327 | 0,330 | 0,000 | 0,085 | 0,107 | 0,094 | 0,070 | 0,034 | 0,076 | 0,079 | |
| | 0,253 | 0,333 | 0,377 | 0,353 | 0,321 | | | | 0,000 | 0,080 | 0,124 | 0,100 | 0,068 | | | | |
| 0,8 | 0,267 | 0,340 | 0,349 | 0,337 | 0,306 | | | | 0,000 | 0,073 | 0,082 | 0,070 | 0,039 | | | | |
| | 0,264 | 0,344 | 0,356 | 0,337 | 0,303 | 0,219 | 0,192 | 0,183 | 0,000 | 0,080 | 0,092 | 0,073 | 0,039 | -0,045 | -0,072 | -0,081 | |
| | 0,264 | 0,323 | 0,338 | 0,358 | 0,298 | | | | 0,000 | 0,059 | 0,074 | 0,094 | 0,034 | | | | |
| 1,6 | 0,254 | 0,318 | 0,302 | 0,259 | 0,219 | | | | 0,000 | 0,064 | 0,048 | 0,005 | -0,035 | | | | |
| | 0,247 | 0,300 | 0,299 | 0,271 | 0,214 | 0,128 | 0,110 | 0,098 | 0,000 | 0,053 | 0,052 | 0,024 | -0,033 | -0,119 | -0,137 | -0,149 | |
| | 0,258 | 0,311 | 0,311 | 0,295 | 0,259 | | | | 0,000 | 0,053 | 0,053 | 0,037 | 0,001 | | | | |
| 3,1 | 0,275 | 0,303 | 0,285 | 0,231 | 0,225 | | | | 0,000 | 0,028 | 0,010 | -0,044 | -0,050 | | | | |
| | 0,251 | 0,283 | 0,271 | 0,228 | 0,196 | 0,103 | 0,090 | 0,077 | 0,000 | 0,032 | 0,020 | -0,023 | -0,055 | -0,148 | -0,161 | -0,174 | |
| | 0,268 | 0,286 | 0,277 | 0,233 | 0,208 | | | | 0,000 | 0,018 | 0,009 | -0,035 | -0,060 | | | | |
| 6,3 | 0,278 | 0,287 | 0,245 | 0,222 | 0,207 | | | | 0,000 | 0,009 | -0,033 | -0,056 | -0,071 | | | | |
| | 0,279 | 0,297 | 0,274 | 0,240 | 0,219 | 0,136 | 0,116 | 0,104 | 0,000 | 0,018 | -0,005 | -0,039 | -0,060 | -0,143 | -0,163 | -0,175 | |
| | 0,253 | 0,263 | 0,228 | 0,199 | 0,190 | | | | 0,000 | 0,010 | -0,025 | -0,054 | -0,063 | | | | |
| 12,5 | 0,258 | 0,242 | 0,196 | 0,185 | 0,173 | | | | 0,000 | -0,016 | -0,062 | -0,073 | -0,085 | | | | |
| | 0,290 | 0,275 | 0,234 | 0,209 | 0,205 | 0,195 | 0,194 | 0,178 | 0,000 | -0,015 | -0,056 | -0,081 | -0,085 | -0,095 | -0,096 | -0,112 | |
| | 0,274 | 0,269 | 0,221 | 0,206 | 0,193 | | | | 0,000 | -0,005 | -0,053 | -0,068 | -0,081 | | | | |
| 25,0 | 0,302 | 0,260 | 0,234 | 0,222 | 0,215 | | | | 0,000 | -0,042 | -0,068 | -0,080 | -0,087 | | | | |
| | 0,287 | 0,245 | 0,231 | 0,210 | 0,206 | 0,204 | 0,205 | 0,188 | 0,000 | -0,042 | -0,056 | -0,077 | -0,081 | -0,083 | -0,082 | -0,099 | |
| | 0,298 | 0,262 | 0,237 | 0,224 | 0,209 | | | | 0,000 | -0,036 | -0,061 | -0,074 | -0,089 | | | | |
| 50,0 | 0,282 | 0,241 | 0,221 | 0,208 | 0,210 | | | | 0,000 | -0,041 | -0,061 | -0,074 | -0,072 | | | | |
| | 0,302 | 0,253 | 0,237 | 0,228 | 0,217 | 0,218 | 0,212 | 0,201 | 0,000 | -0,049 | -0,065 | -0,074 | -0,085 | -0,084 | -0,090 | -0,101 | |
| | 0,298 | 0,250 | 0,237 | 0,225 | 0,203 | | | | 0,000 | -0,048 | -0,061 | -0,073 | -0,095 | | | | |
| 100,0 | 0,295 | 0,225 | 0,210 | 0,206 | 0,200 | | | | 0,000 | -0,070 | -0,085 | -0,089 | -0,095 | | | | |
| | 0,290 | 0,228 | 0,231 | 0,213 | 0,212 | 0,203 | 0,209 | 0,203 | 0,000 | -0,062 | -0,059 | -0,077 | -0,078 | -0,087 | -0,081 | -0,087 | |
| | 0,274 | 0,203 | 0,196 | 0,183 | 0,177 | | | | 0,000 | -0,071 | -0,078 | -0,091 | -0,097 | | | | |

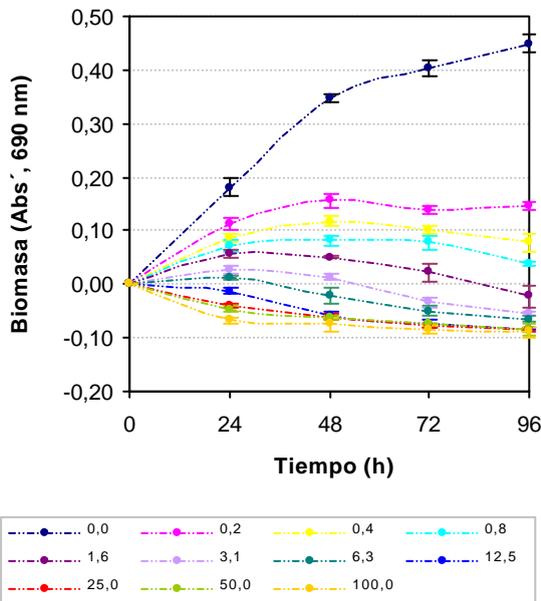
Tabla A VII.15.**Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs´)**

| mg/L CADMIO (II) | | | | | | | | | | | | |
|-------------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|-----------------|
| t (h) | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,1 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | |
| 24 | 0,181 | 0,113 | 0,086 | 0,071 | 0,057 | 0,026 | 0,012 | -0,012 | -0,040 | -0,046 | -0,068 | Promedio |
| | 0,017 | 0,013 | 0,007 | 0,011 | 0,006 | 0,007 | 0,005 | 0,006 | 0,003 | 0,004 | 0,005 | DesvEst |
| 48 | 0,347 | 0,157 | 0,117 | 0,083 | 0,051 | 0,013 | -0,021 | -0,057 | -0,062 | -0,062 | -0,074 | Promedio |
| | 0,006 | 0,012 | 0,009 | 0,009 | 0,003 | 0,006 | 0,014 | 0,005 | 0,006 | 0,002 | 0,013 | DesvEst |
| 72 | 0,403 | 0,139 | 0,101 | 0,079 | 0,022 | -0,034 | -0,050 | -0,074 | -0,077 | -0,074 | -0,086 | Promedio |
| | 0,015 | 0,008 | 0,007 | 0,013 | 0,016 | 0,011 | 0,009 | 0,007 | 0,003 | 0,001 | 0,008 | DesvEst |
| 96 | 0,450 | 0,146 | 0,079 | 0,037 | -0,022 | -0,055 | -0,065 | -0,084 | -0,086 | -0,084 | -0,090 | Promedio |
| | 0,017 | 0,008 | 0,017 | 0,003 | 0,020 | 0,005 | 0,006 | 0,002 | 0,004 | 0,012 | 0,010 | DesvEst |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

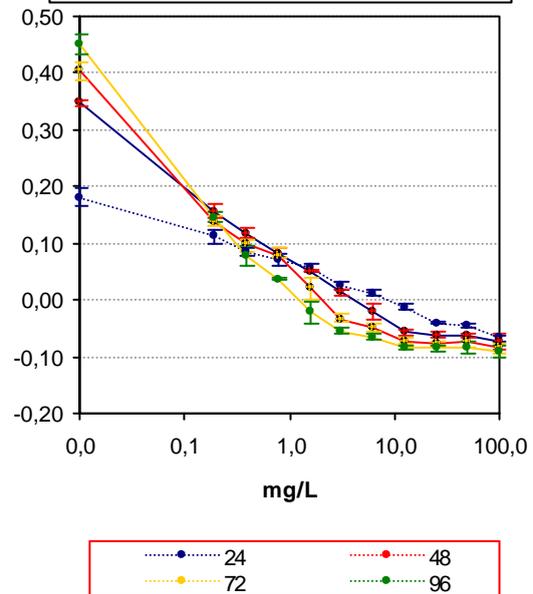


Tabla A VII.16.

Valores de NOEC y LOEC experimentales obtenidos para *C. gracilis* expuesta a diferentes concentraciones de CADMIO (II).

| <i>C. gracilis</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|--|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,960 | | 0,980 | | 0,970 | | 0,954 | |
| B calculado | 8,33 | | 10,03 | | 13,72 | | 14,78 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| m/L Cd (II) | t _i | p |
| 0,2 | 9,80 (*) | 0,00238 | 26,56 (*) | 0,00001 | 32,95 (*) | 0,00001 | 33,28 (*) | 0,00000 |
| 0,4 | 13,63 | 0,00039 | 32,10 | 0,00000 | 37,78 | 0,00000 | 40,71 | 0,00001 |
| 0,8 | 15,83 | 0,00032 | 36,89 | 0,00000 | 40,48 | 0,00000 | 45,24 | 0,00000 |
| 1,6 | 17,84 | 0,00014 | 41,31 | 0,00000 | 47,60 | 0,00000 | 51,79 | 0,00000 |
| 3,1 | 22,24 | 0,00006 | 46,61 | 0,00000 | 54,59 | 0,00000 | 55,37 | 0,00000 |
| 6,3 | 24,20 | 0,00004 | 51,35 | 0,00000 | 56,54 | 0,00000 | 56,43 | 0,00000 |
| 12,5 | 27,69 | 0,00002 | 56,38 | 0,00000 | 59,58 | 0,00000 | 58,52 | 0,00000 |
| 25,0 | 31,71 | 0,00001 | 57,03 | 0,00000 | 59,96 | 0,00000 | 58,74 | 0,00000 |
| 50,0 | 32,57 | 0,00001 | 57,12 | 0,00000 | 59,54 | 0,00000 | 58,55 | 0,00000 |
| 100,0 | 35,67 | 0,00001 | 58,75 | 0,00000 | 61,04 | 0,00000 | 59,21 | 0,00000 |
| MSD | 0,018 | | 0,019 | | 0,021 | | 0,024 | |
| % reducción | 10,17 | | 5,45 | | 5,24 | | 5,35 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|----------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,955 | | 0,951 | | 0,959 | | 0,969 | | 0,971 | | 0,970 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 1,76 | | 1,93 | | 2,66 | | 5,46 | | 13,51 | | 13,72 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| m/L Cd (II) | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,2 | 26,96(*) | 0,00 | 27,76(*) | 0,00 | 29,03(*) | 0,00 | 30,65(*) | 0,00 | 32,31(*) | 0,00 | 32,95(*) | 0,00 |
| 0,4 | 30,91 | 0,00 | 31,83 | 0,00 | 33,28 | 0,00 | 35,14 | 0,00 | 37,04 | 0,00 | 37,78 | 0,00 |
| 0,8 | 33,12 | 0,00 | 34,11 | 0,00 | 35,67 | 0,00 | 37,66 | 0,00 | 39,69 | 0,00 | 40,48 | 0,00 |
| 1,6 | 38,94 | 0,00 | 40,10 | 0,00 | 41,93 | 0,00 | 44,28 | 0,00 | 46,66 | 0,00 | 47,60 | 0,00 |
| 3,1 | 44,66 | 0,00 | 45,99 | 0,00 | 48,09 | 0,00 | 50,78 | 0,00 | 53,52 | 0,00 | 54,59 | 0,00 |
| 6,3 | --- | --- | 47,64 | 0,00 | 49,81 | 0,00 | 52,60 | 0,00 | 55,43 | 0,00 | 56,54 | 0,00 |
| 12,5 | --- | --- | --- | --- | 52,49 | 0,00 | 55,42 | 0,00 | 58,41 | 0,00 | 59,58 | 0,00 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 55,77 | 0,00 | 58,78 | 0,00 | 59,96 | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 58,37 | 0,00 | 59,54 | 0,00 |
| 100,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 61,04 | 0,00 |
| MSD | 0,024 | | 0,024 | | 0,023 | | 0,022 | | 0,021 | | 0,021 | |
| % reducción | 6,07 | | 5,96 | | 5,77 | | 5,51 | | 5,27 | | 5,24 | |
| * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | | | | | |

Tabla A VI.17.
Valores de ICp del ensayo de *C. gracilis* y Cd (II) a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de Cd (II) estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,0149 | 0,0140 | 0,0145 | 0,0149 | 0,0154 | 0,0160 | 0,0030 |
| | 25 | 0,0745 | 0,0699 | 0,0723 | 0,0745 | 0,0770 | 0,0798 | 0,0013 |
| | 50 | 0,1490 | 0,1406 | 0,1450 | 0,1490 | 0,1540 | 0,1596 | 0,0025 |
| | 75 | 0,3902 | 0,3217 | 0,3576 | 0,4058 | 0,5064 | 0,6343 | 0,0413 |
| | 95 | 1,6932 | 1,0807 | 1,4015 | 1,7701 | 2,2736 | 2,9122 | 2,9122 |
| 96 | 5 | 0,0145 | 0,0137 | 0,0141 | 0,0145 | 0,0149 | 0,0154 | 0,0002 |
| | 25 | 0,0723 | 0,0684 | 0,0704 | 0,0723 | 0,0746 | 0,0771 | 0,0011 |
| | 50 | 0,1445 | 0,1363 | 0,1406 | 0,1446 | 0,1489 | 0,1537 | 0,0022 |
| | 75 | 0,2932 | 0,2440 | 0,2698 | 0,2943 | 0,3279 | 0,3659 | 0,0152 |
| | 95 | 1,0921 | 1,0059 | 1,0510 | 1,0915 | 1,1235 | 1,1582 | 0,0199 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; DesvEst.: Desviación estándar

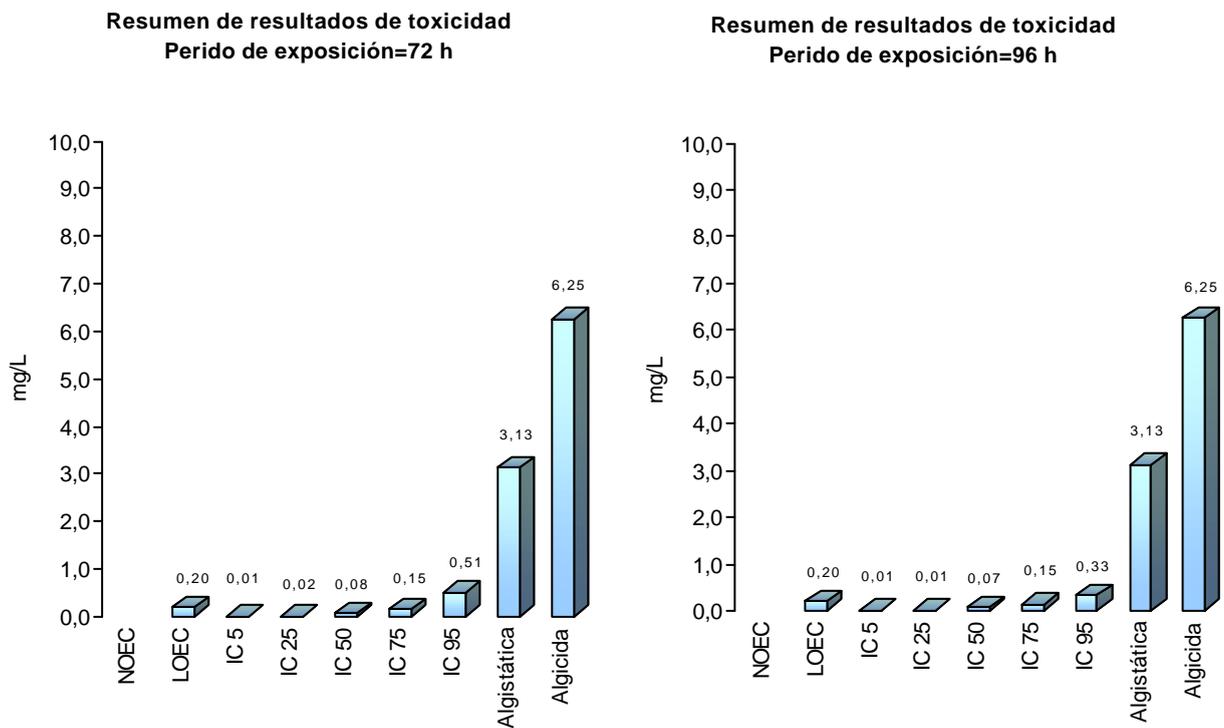
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las concentraciones más altas de Cd (II) ensayadas con *C. gracilis* (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 y 0,78 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo se observó cambios en la biomasa de los viales de 3,13 mg/L e inferiores.

- Concentración alguistática= 3,13 mg/L
- Concentración alguicida= 6,25 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del *cadmio* y *C. gracilis*



2.5. Tetraselmis chuii

Tabla A VII.18.

Evolución de la biomasa de Tetraselmis chuii. Ensayo de CADMIO (II).

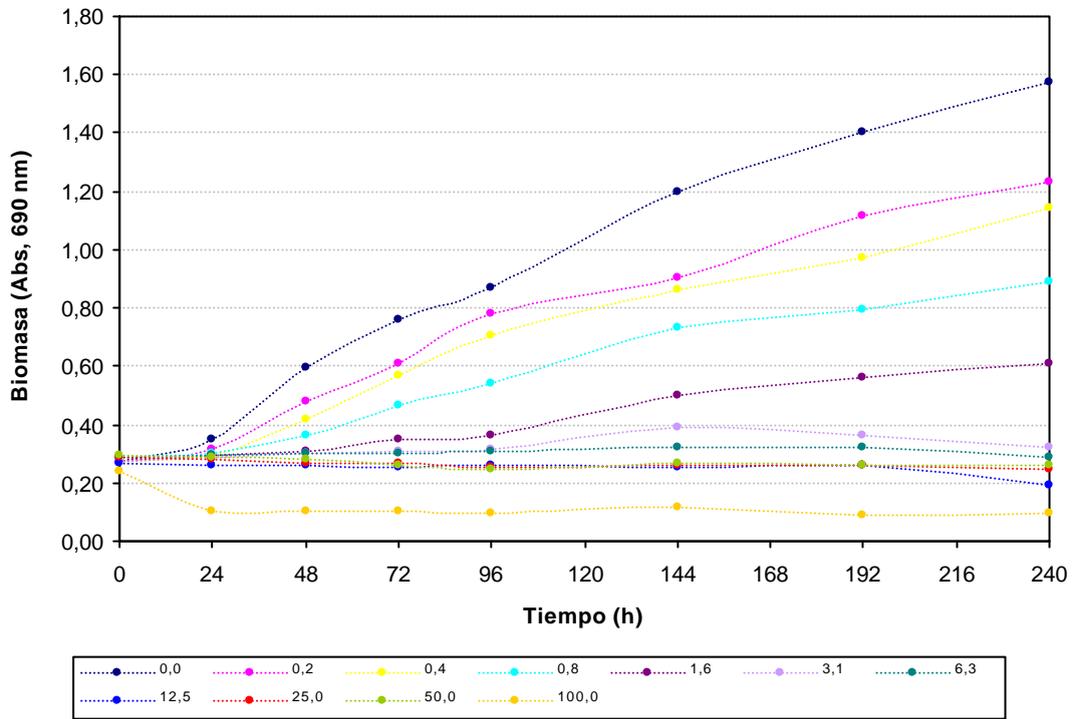
| <u>T. chuii</u> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| 0,0 | 0,258 | 0,362 | 0,587 | 0,723 | 0,832 | | | | 0,000 | 0,104 | 0,329 | 0,465 | 0,574 | | | | |
| | 0,286 | 0,359 | 0,625 | 0,788 | 0,934 | 1,200 | 1,404 | 1,573 | 0,000 | 0,073 | 0,339 | 0,502 | 0,648 | 0,914 | 1,118 | 1,287 | |
| | 0,274 | 0,333 | 0,572 | 0,763 | 0,842 | | | | 0,000 | 0,059 | 0,298 | 0,489 | 0,568 | | | | |
| 0,2 | 0,291 | 0,353 | 0,512 | 0,654 | 0,813 | | | | 0,000 | 0,062 | 0,221 | 0,363 | 0,522 | | | | |
| | 0,282 | 0,306 | 0,482 | 0,618 | 0,784 | 0,903 | 1,117 | 1,230 | 0,000 | 0,024 | 0,200 | 0,336 | 0,502 | 0,621 | 0,835 | 0,948 | |
| | 0,257 | 0,289 | 0,446 | 0,549 | 0,744 | | | | 0,000 | 0,032 | 0,189 | 0,292 | 0,487 | | | | |
| 0,4 | 0,281 | 0,326 | 0,448 | 0,627 | 0,748 | | | | 0,000 | 0,045 | 0,167 | 0,346 | 0,467 | | | | |
| | 0,257 | 0,282 | 0,397 | 0,546 | 0,679 | 0,863 | 0,973 | 1,140 | 0,000 | 0,025 | 0,140 | 0,289 | 0,422 | 0,606 | 0,716 | 0,883 | |
| | 0,274 | 0,285 | 0,406 | 0,539 | 0,686 | | | | 0,000 | 0,011 | 0,132 | 0,265 | 0,412 | | | | |
| 0,8 | 0,286 | 0,311 | 0,365 | 0,481 | 0,535 | | | | 0,000 | 0,025 | 0,079 | 0,195 | 0,249 | | | | |
| | 0,286 | 0,298 | 0,374 | 0,493 | 0,576 | 0,735 | 0,792 | 0,889 | 0,000 | 0,012 | 0,088 | 0,207 | 0,290 | 0,449 | 0,506 | 0,603 | |
| | 0,290 | 0,298 | 0,349 | 0,421 | 0,515 | | | | 0,000 | 0,008 | 0,059 | 0,131 | 0,225 | | | | |
| 1,6 | 0,274 | 0,298 | 0,302 | 0,366 | 0,356 | | | | 0,000 | 0,024 | 0,028 | 0,092 | 0,082 | | | | |
| | 0,283 | 0,297 | 0,316 | 0,343 | 0,377 | 0,498 | 0,558 | 0,607 | 0,000 | 0,014 | 0,033 | 0,060 | 0,094 | 0,215 | 0,275 | 0,324 | |
| | 0,271 | 0,284 | 0,302 | 0,345 | 0,346 | | | | 0,000 | 0,013 | 0,031 | 0,074 | 0,075 | | | | |
| 3,1 | 0,282 | 0,295 | 0,306 | 0,321 | 0,336 | | | | 0,000 | 0,013 | 0,024 | 0,039 | 0,054 | | | | |
| | 0,271 | 0,288 | 0,306 | 0,301 | 0,306 | 0,387 | 0,366 | 0,322 | 0,000 | 0,017 | 0,035 | 0,030 | 0,035 | 0,116 | 0,095 | 0,051 | |
| | 0,270 | 0,278 | 0,297 | 0,300 | 0,306 | | | | 0,000 | 0,008 | 0,027 | 0,030 | 0,036 | | | | |
| 6,3 | 0,280 | 0,293 | 0,296 | 0,291 | 0,297 | | | | 0,000 | 0,013 | 0,016 | 0,011 | 0,017 | | | | |
| | 0,293 | 0,308 | 0,300 | 0,307 | 0,316 | 0,319 | 0,321 | 0,289 | 0,000 | 0,015 | 0,007 | 0,014 | 0,023 | 0,026 | 0,028 | -0,004 | |
| | 0,288 | 0,291 | 0,302 | 0,298 | 0,318 | | | | 0,000 | 0,003 | 0,014 | 0,010 | 0,030 | | | | |
| 12,5 | 0,261 | 0,259 | 0,263 | 0,231 | 0,259 | | | | 0,000 | -0,002 | 0,002 | -0,030 | -0,002 | | | | |
| | 0,265 | 0,263 | 0,262 | 0,255 | 0,258 | 0,256 | 0,262 | 0,194 | 0,000 | -0,002 | -0,003 | -0,010 | -0,007 | -0,009 | -0,003 | -0,071 | |
| | 0,280 | 0,268 | 0,265 | 0,268 | 0,257 | | | | 0,000 | -0,012 | -0,015 | -0,012 | -0,023 | | | | |
| 25,0 | 0,300 | 0,296 | 0,287 | 0,283 | 0,257 | | | | 0,000 | -0,004 | -0,013 | -0,017 | -0,043 | | | | |
| | 0,285 | 0,282 | 0,267 | 0,264 | 0,253 | 0,258 | 0,258 | 0,249 | 0,000 | -0,003 | -0,018 | -0,021 | -0,032 | -0,027 | -0,027 | -0,036 | |
| | 0,277 | 0,259 | 0,247 | 0,249 | 0,247 | | | | 0,000 | -0,018 | -0,030 | -0,028 | -0,030 | | | | |
| 50,0 | 0,287 | 0,269 | 0,274 | 0,251 | 0,227 | | | | 0,000 | -0,018 | -0,013 | -0,036 | -0,060 | | | | |
| | 0,313 | 0,314 | 0,292 | 0,276 | 0,262 | 0,269 | 0,259 | 0,262 | 0,000 | 0,001 | -0,021 | -0,037 | -0,051 | -0,044 | -0,054 | -0,051 | |
| | 0,292 | 0,287 | 0,277 | 0,244 | 0,246 | | | | 0,000 | -0,005 | -0,015 | -0,048 | -0,046 | | | | |
| 100,0 | 0,251 | 0,120 | 0,114 | 0,121 | 0,114 | | | | 0,000 | -0,131 | -0,137 | -0,130 | -0,137 | | | | |
| | 0,242 | 0,101 | 0,107 | 0,105 | 0,089 | 0,118 | 0,091 | 0,097 | 0,000 | -0,141 | -0,135 | -0,137 | -0,153 | -0,124 | -0,151 | -0,145 | |
| | 0,233 | 0,079 | 0,085 | 0,082 | 0,087 | | | | 0,000 | -0,154 | -0,148 | -0,151 | -0,146 | | | | |

Tabla A VII.19.

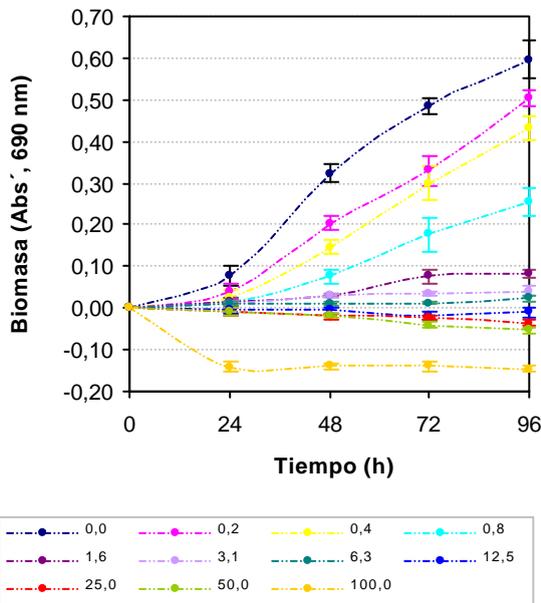
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs')

| t (h) | mg/L CADMIO (II) | | | | | | | | | | | Promedio |
|-------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|----------|
| | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,1 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | |
| 24 | 0,079 | 0,039 | 0,027 | 0,015 | 0,017 | 0,013 | 0,010 | -0,005 | -0,008 | -0,007 | -0,142 | DesvEst |
| | 0,023 | 0,020 | 0,017 | 0,009 | 0,006 | 0,005 | 0,006 | 0,006 | 0,008 | 0,010 | 0,012 | |
| 48 | 0,322 | 0,203 | 0,146 | 0,075 | 0,031 | 0,029 | 0,012 | -0,005 | -0,020 | -0,016 | -0,140 | DesvEst |
| | 0,021 | 0,016 | 0,018 | 0,015 | 0,003 | 0,006 | 0,005 | 0,009 | 0,009 | 0,004 | 0,007 | |
| 72 | 0,485 | 0,330 | 0,300 | 0,178 | 0,075 | 0,033 | 0,012 | -0,017 | -0,022 | -0,040 | -0,139 | DesvEst |
| | 0,019 | 0,036 | 0,042 | 0,041 | 0,016 | 0,005 | 0,002 | 0,011 | 0,006 | 0,007 | 0,011 | |
| 96 | 0,597 | 0,504 | 0,434 | 0,255 | 0,084 | 0,042 | 0,023 | -0,011 | -0,035 | -0,052 | -0,145 | DesvEst |
| | 0,045 | 0,018 | 0,029 | 0,033 | 0,010 | 0,011 | 0,007 | 0,011 | 0,007 | 0,007 | 0,008 | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

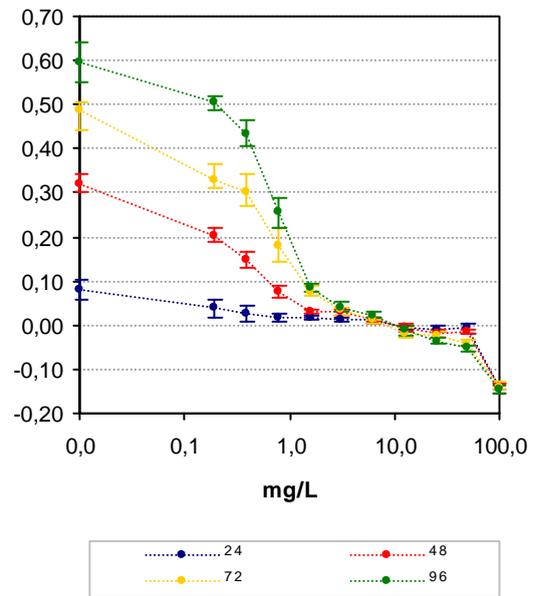


Tabla A VII.20.

Valores de NOEC y LOEC experimentales obtenidos para *T. chuii* expuesta a diferentes concentraciones de CADMIO (II).

| <i>C. gracilis</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|--|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,971 | | 0,979 | | 0,950 | | 0,934 | |
| B calculado | 9,81 | | 13,08 | | 17,25 | | 16,83 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| m/L Cd (II) | t _i | p |
| 0,2 | 3,84 (*) | 0,04471 | 12,21 (*) | 0,00078 | 9,55 (*) | 0,00134 | 5,47 (*) | 0,01411 |
| 0,4 | 5,04 | 0,01775 | 18,08 | 0,00021 | 11,42 | 0,00108 | 9,59 | 0,00306 |
| 0,8 | 6,21 | 0,00555 | 25,38 | 0,00004 | 18,14 | 0,00002 | 20,12 | 0,00022 |
| 1,6 | 6,02 | 0,00548 | 29,98 | 0,00001 | 25,27 | 0,00000 | 30,19 | 0,00002 |
| 3,1 | 6,44 | 0,00411 | 30,19 | 0,00001 | 27,98 | 0,00000 | 32,66 | 0,00002 |
| 6,3 | 6,67 | 0,00388 | 31,87 | 0,00001 | 29,30 | 0,00000 | 33,74 | 0,00001 |
| 12,5 | 8,20 | 0,00180 | 33,69 | 0,00001 | 30,98 | 0,00000 | 35,74 | 0,00001 |
| 25,0 | 8,49 | 0,00177 | 35,23 | 0,00001 | 31,27 | 0,00000 | 37,17 | 0,00001 |
| 50,0 | 8,39 | 0,00199 | 34,82 | 0,00001 | 32,40 | 0,00000 | 38,19 | 0,00001 |
| 100,0 | 21,54 | 0,00006 | 47,54 | 0,00000 | 38,50 | 0,00000 | 43,66 | 0,00000 |
| MSD | 0,027 | | 0,026 | | 0,043 | | 0,045 | |
| % reducción | 34,39 | | 7,97 | | 8,83 | | 7,52 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,980 | | 0,972 | | 0,968 | | 0,959 | | 0,950 | | 0,950 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 5,49 | | 9,55 | | 10,80 | | 13,94 | | 16,31 | | 17,25 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| m/L Cd (II) | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,2 | 7,34(*) | 0,00 | 7,91(*) | 0,00 | 8,33(*) | 0,00 | 8,80(*) | 0,00 | 9,23(*) | 0,00 | 9,55(*) | 0,00 |
| 0,4 | 8,78 | 0,00 | 9,46 | 0,00 | 9,96 | 0,00 | 10,53 | 0,00 | 11,04 | 0,00 | 11,42 | 0,00 |
| 0,8 | 13,94 | 0,00 | 15,02 | 0,00 | 15,82 | 0,00 | 16,72 | 0,00 | 17,53 | 0,00 | 18,14 | 0,00 |
| 1,6 | 19,42 | 0,00 | 20,92 | 0,00 | 22,04 | 0,00 | 23,29 | 0,00 | 24,42 | 0,00 | 25,27 | 0,00 |
| 3,1 | 21,50 | 0,00 | 23,17 | 0,00 | 24,40 | 0,00 | 25,79 | 0,00 | 27,04 | 0,00 | 27,98 | 0,00 |
| 6,3 | --- | --- | 24,26 | 0,00 | 25,55 | 0,00 | 27,00 | 0,00 | 28,31 | 0,00 | 29,30 | 0,00 |
| 12,5 | --- | --- | --- | --- | 27,02 | 0,00 | 28,55 | 0,00 | 29,94 | 0,00 | 30,98 | 0,00 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 28,82 | 0,00 | 30,21 | 0,00 | 31,27 | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 31,31 | 0,00 | 32,40 | 0,00 |
| 100,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 38,50 | 0,00 |
| MSD | 0,053 | | 0,050 | | 0,048 | | 0,045 | | 0,044 | | 0,043 | |
| % reducción | 10,87 | | 10,22 | | 9,81 | | 9,36 | | 9,00 | | 8,83 | |
| * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | | | | | |

Tabla A VI.21.
Valores de ICp del ensayo de *T. chuii* y Cd (II) a las 72 y 96 horas de ensayo.

| Concentración de Cd (II) estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | | | |
|---|--------|-------------|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| t (h) | % inh. | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,0305 | 0,0192 | 0,0251 | 0,0311 | 0,0387 | 0,0476 | 0,0036 |
| | 25 | 0,1526 | 0,0964 | 0,1259 | 0,1557 | 0,1938 | 0,2390 | 0,0187 |
| | 50 | 0,5738 | 0,3748 | 0,4790 | 0,5701 | 0,6533 | 0,7408 | 0,0467 |
| | 75 | 1,2115 | 0,6246 | 0,9320 | 1,2016 | 1,3321 | 1,4647 | 0,0896 |
| | 95 | 4,4043 | 3,5279 | 3,9870 | 4,3863 | 4,8095 | 5,2551 | 5,2551 |
| 96 | 5 | 0,0626 | 0,0231 | 0,0438 | 0,0654 | 0,1017 | 0,1447 | 0,0148 |
| | 25 | 0,3523 | 0,1313 | 0,2470 | 0,3517 | 0,4410 | 0,5385 | 0,0521 |
| | 50 | 0,6859 | 0,5455 | 0,6190 | 0,6870 | 0,7591 | 0,8396 | 0,0354 |
| | 75 | 1,2635 | 1,0913 | 1,1815 | 1,2620 | 1,3328 | 1,4090 | 0,0388 |
| | 95 | 5,1420 | 2,9063 | 4,0774 | 5,1100 | 6,1354 | 7,2281 | 0,5267 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

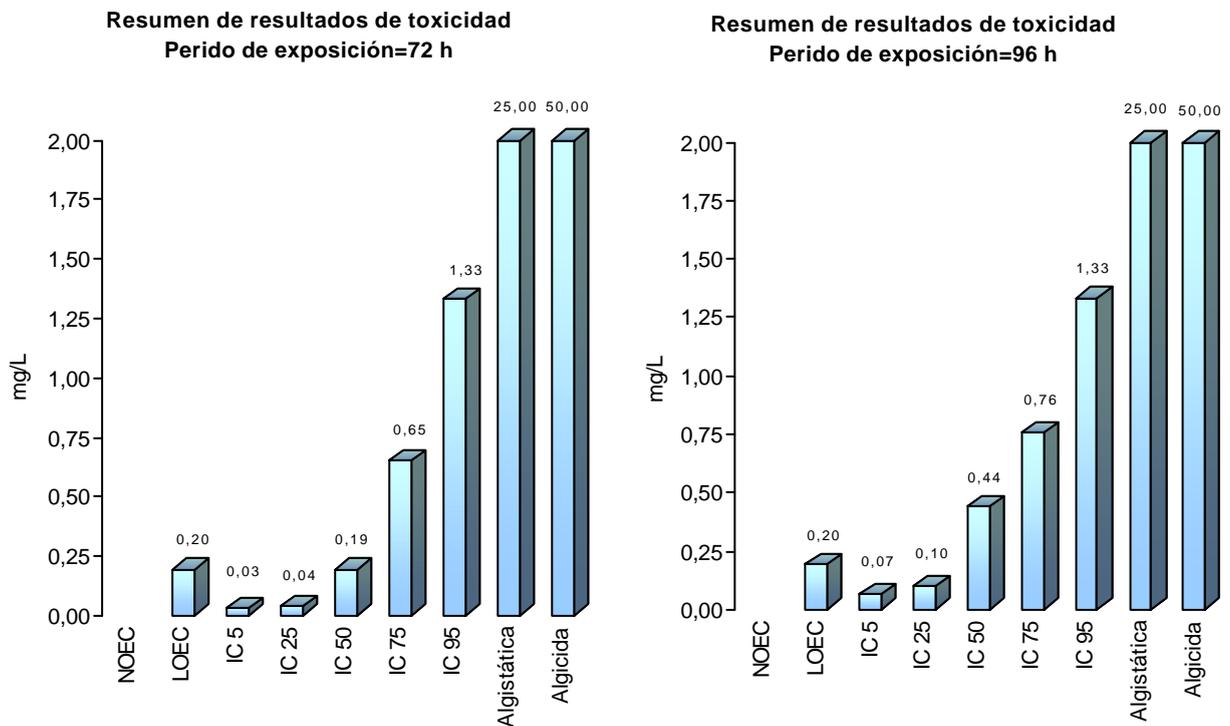
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las concentraciones más altas de Cd (II) ensayadas con *T. chuii* (100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,13, 1,56 y 0,78 mg/L) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo se observó cambios en la biomasa de los viales de 25 mg/L e inferiores.

- Concentración alguistática= 25 mg/L
- Concentración alguicida= 50 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del *cadmio* y *T. chuii*.



3. RESULTADOS CON ARTEMIA

3.1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Recipiente de ensayo: placas petri de vidrio
- N° de réplicas: 5 para cada concentración y control
- N° de organismos por placa: 10
- Volumen de las placas: 30 mL
- Volumen de solución de ensayo: 20 mL
- Agua de dilución: agua de mar sintética
- Medio nutriente adicional: no
- Temperatura de ensayo: $20 \pm 0,1$ °C
- Iluminación: no, oscuridad
- Aireación: no
- Duración del ensayo: 3 días
- Respuesta observada: mortalidad, inhibición en la capacidad natatoria

ORGANISMOS DE ENSAYO

- *Artemia franciscana*, código 1309 según clasificación del Instituto de la Artemia, Bélgica obtenidos a partir de la eclosión de quistes de resistencia en condiciones óptimas de luz (iluminación constante), aireación (continua) y temperatura ($20 \pm 0,1$ °C).
- Nauplios de una misma cohorte de *Artemia franciscana* de entre 6 a 12 horas de vida (estadio I)

RESULTADOS OBTENIDOS

- Número de supervivientes a las 24, 48 y 72 horas de ensayo
- LC_p mediante el método Probit

3.2 RESULTADOS OBTENIDOS

Tabla A VII.22.

Ensayos de toxicidad aguda con *Artemia*. Ensayo de CADMIO (II).

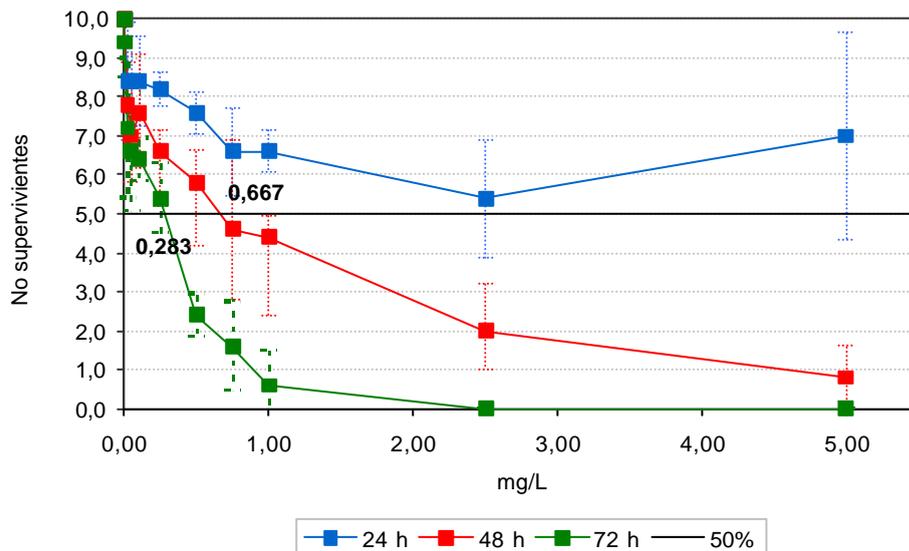
| mg/L Cd (II) | 24 h | | | 48 h | | | 72 h | | | N Total |
|--------------|------|---|---|------|---|----|------|---|----|---------|
| | + | ± | - | + | ± | - | + | ± | - | |
| 0,000 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 |
| 0,001 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 7 | 2 | 1 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 6 | 4 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 8 | 0 | 2 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 6 | 4 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 7 | 3 | 0 | 10 |
| 0,025 | 10 | 0 | 0 | 8 | 1 | 1 | 6 | 3 | 1 | 10 |
| | 8 | 0 | 2 | 6 | 1 | 3 | 4 | 2 | 4 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 8 | 1 | 1 | 6 | 3 | 1 | 10 |
| | 7 | 0 | 3 | 6 | 1 | 5 | 4 | 1 | 5 | 10 |
| | 7 | 0 | 3 | 7 | 0 | 3 | 5 | 2 | 3 | 10 |
| 0,050 | 7 | 0 | 3 | 5 | 1 | 4 | 4 | 2 | 4 | 10 |
| | 8 | 0 | 2 | 6 | 1 | 3 | 3 | 2 | 5 | 10 |
| | 9 | 0 | 1 | 6 | 1 | 3 | 3 | 4 | 3 | 10 |
| | 7 | 1 | 2 | 5 | 1 | 4 | 4 | 2 | 4 | 10 |
| | 9 | 1 | 0 | 7 | 2 | 1 | 6 | 3 | 1 | 10 |
| 0,10 | 7 | 3 | 0 | 6 | 3 | 1 | 4 | 2 | 4 | 10 |
| | 8 | 1 | 1 | 8 | 1 | 1 | 6 | 1 | 3 | 10 |
| | 8 | 0 | 2 | 8 | 0 | 2 | 3 | 4 | 3 | 10 |
| | 8 | 0 | 2 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 4 | 10 |
| | 6 | 1 | 3 | 5 | 1 | 4 | 5 | 1 | 4 | 10 |
| 0,25 | 7 | 1 | 2 | 5 | 2 | 3 | 3 | 1 | 6 | 10 |
| | 8 | 0 | 2 | 6 | 0 | 4 | 5 | 0 | 5 | 10 |
| | 7 | 2 | 1 | 4 | 2 | 4 | 3 | 3 | 4 | 10 |
| | 8 | 0 | 2 | 5 | 2 | 3 | 2 | 4 | 4 | 10 |
| | 7 | 1 | 2 | 6 | 1 | 3 | 4 | 2 | 4 | 10 |
| 0,50 | 6 | 1 | 3 | 4 | 2 | 4 | 2 | 0 | 8 | 10 |
| | 6 | 2 | 2 | 4 | 3 | 3 | 0 | 2 | 8 | 10 |
| | 8 | 0 | 2 | 4 | 1 | 5 | 2 | 0 | 8 | 10 |
| | 7 | 0 | 3 | 5 | 0 | 5 | 2 | 1 | 7 | 10 |
| | 7 | 1 | 2 | 4 | 2 | 4 | 1 | 2 | 7 | 10 |
| 0,75 | 6 | 0 | 4 | 3 | 1 | 6 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 5 | 0 | 5 | 0 | 1 | 9 | 0 | 2 | 8 | 10 |
| | 6 | 1 | 3 | 5 | 1 | 4 | 1 | 1 | 8 | 10 |
| | 6 | 2 | 2 | 3 | 4 | 3 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| | 5 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 2 | 1 | 7 | 10 |
| 1,0 | 5 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 4 | 3 | 3 | 3 | 1 | 6 | 1 | 0 | 9 | 10 |
| | 3 | 3 | 4 | 1 | 3 | 6 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 6 | 0 | 4 | 2 | 2 | 6 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 5 | 2 | 3 | 3 | 2 | 5 | 0 | 2 | 8 | 10 |
| 2,5 | 4 | 4 | 2 | 1 | 1 | 8 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 5 | 0 | 5 | 2 | 1 | 7 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 3 | 2 | 5 | 1 | 2 | 7 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 4 | 0 | 6 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 5 | 0 | 5 | 1 | 1 | 8 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| 5,0 | 3 | 3 | 4 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 2 | 8 | 0 | 0 | 1 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 1 | 7 | 2 | 0 | 2 | 8 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 2 | 6 | 2 | 1 | 0 | 9 | 0 | 0 | 10 | 10 |
| | 2 | 1 | 7 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 10 |

Tabla A VII.23.
Promedios de supervivientes. Ensayo de CADMIO (II).

| mg/L Cd (II) | 24 h | | 48 h | | 72 h | | Promedio DesvEst |
|--------------|---------|------|---------|------|---------|------|---------------------|
| | + Total | ± | + Total | ± | + Total | ± | |
| 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 0,001 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 9,4 | 2,6 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,89 | 1,67 | |
| 0,025 | 8,4 | 0,0 | 7,8 | 0,8 | 7,2 | 2,2 | Promedio DesvEst |
| | 1,52 | 0,00 | 1,10 | 0,45 | 1,79 | 0,84 | |
| 0,050 | 8,4 | 0,4 | 7,0 | 1,2 | 6,6 | 2,6 | Promedio DesvEst |
| | 1,14 | 0,55 | 1,22 | 0,45 | 1,52 | 0,89 | |
| 0,10 | 8,4 | 1,0 | 7,6 | 1,4 | 6,4 | 2,2 | Promedio DesvEst |
| | 1,14 | 1,22 | 1,52 | 1,14 | 0,55 | 1,30 | |
| 0,25 | 8,2 | 0,8 | 6,6 | 1,4 | 5,4 | 2,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,45 | 0,84 | 0,55 | 0,89 | 0,89 | 1,58 | |
| 0,50 | 7,6 | 0,8 | 5,8 | 1,6 | 2,4 | 1,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,55 | 0,84 | 0,84 | 1,14 | 0,55 | 1,00 | |
| 0,75 | 6,6 | 1,0 | 4,6 | 1,8 | 1,6 | 0,8 | Promedio DesvEst |
| | 1,14 | 1,00 | 2,30 | 1,30 | 1,14 | 0,84 | |
| 1,0 | 6,6 | 2,0 | 4,4 | 2,0 | 0,6 | 0,4 | Promedio DesvEst |
| | 0,55 | 1,22 | 0,55 | 0,71 | 0,89 | 0,89 | |
| 2,5 | 5,4 | 1,2 | 2,0 | 1,0 | 0,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 1,52 | 1,79 | 1,22 | 0,71 | 0,00 | 0,00 | |
| 5,0 | 7,0 | 5,0 | 0,8 | 0,6 | 0,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 2,65 | 2,92 | 0,84 | 0,89 | 0,00 | 0,00 | |

+ Total: Número total de supervivientes; ±: Número de organismos que presentan un descenso en la capacidad natatoria

Variación del número de supervivientes



Las concentraciones incluidas en la zona interior del gráfico muestran los valores de LC₅₀ obtenidos mediante el método de interpolación gráfica

Tabla A VI.24.
Resultados obtenidos mediante el método PROBIT

| Ensayo de 24 h | Concentración estimada de Cadmio(II) (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|---|----------------------|----------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 0,000 | 0,000 | 0,001 |
| LC/EC 5,00 | 0,003 | 0,000 | 0,011 |
| LC/EC 10,00 | 0,018 | 0,003 | 0,047 |
| LC/EC 15,00 | 0,064 | 0,019 | 0,134 |
| LC/EC 50,00 | 12,865 | 4,579 | 84,944 |
| LC/EC 85,00 | 2586,569 | 271,766 | 213380,859 |
| LC/EC 90,00 | 9071,160 | 703,701 | 1380176,250 |
| LC/EC 95,00 | 58219,570 | 2871,851 | 22011806,000 |
| LC/EC 99,00 | 1902959,000 | 39906,855 | 3991500800,000 |

χ^2 calculado=2,771; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. Se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. No se han podido calcular los límites de confianza de las concentraciones estimadas mediante el programa de cálculo

| Ensayo de 48 h | Concentración estimada de Cadmio(II) (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|---|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 0,001 | 0,000 | 0,004 |
| LC/EC 5,00 | 0,005 | 0,000 | 0,016 |
| LC/EC 10,00 | 0,013 | 0,002 | 0,034 |
| LC/EC 15,00 | 0,025 | 0,005 | 0,058 |
| LC/EC 50,00 | 0,418 | 0,230 | 0,794 |
| LC/EC 85,00 | 7,025 | 2,840 | 36,838 |
| LC/EC 90,00 | 13,691 | 4,807 | 97,824 |
| LC/EC 95,00 | 36,800 | 10,353 | 420,997 |
| LC/EC 99,00 | 235,086 | 42,775 | 6636,247 |

χ^2 calculado=15,872; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados hay que interpretarlos con precaución.

| Ensayo de 72 h | Concentración estimada de Cadmio(II) (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|---|----------------------|--------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 0,001 | 0,000 | 0,005 |
| LC/EC 5,00 | 0,004 | 0,000 | 0,014 |
| LC/EC 10,00 | 0,008 | 0,001 | 0,024 |
| LC/EC 15,00 | 0,013 | 0,002 | 0,035 |
| LC/EC 50,00 | 0,108 | 0,045 | 0,206 |
| LC/EC 85,00 | 0,886 | 0,439 | 3,006 |
| LC/EC 90,00 | 1,457 | 0,666 | 6,413 |
| LC/EC 95,00 | 3,044 | 1,197 | 20,336 |
| LC/EC 99,00 | 12,118 | 3,422 | 185,912 |

χ^2 calculado=13,014; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. Se cumple la condición de homogeneidad de la varianza.

4. ENSAYOS CON BACTERIAS LUMINISCENTES

4.1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Condiciones del ensayo LUMISTOX
- N° de réplicas: 2 para cada concentración y control
- Duración del ensayo: 30 minutos
- Respuesta observada: luminiscencia de las bacterias

ORGANISMOS DE ENSAYO

- Bacterias luminiscentes proporcionadas por la marca comercial *Dr. Lange* para el ensayo de LUMISTOX

RESULTADOS OBTENIDOS

- Inhibición de la luminiscencia a t=15 min, y t=30 min.

4.2. RESULTADOS OBTENIDOS

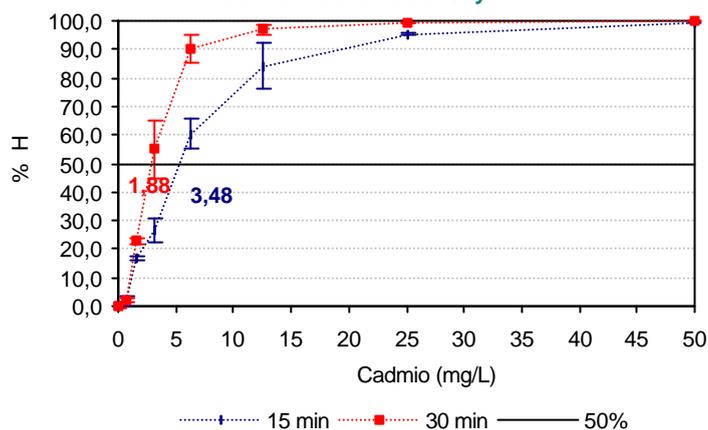
Tabla VII.25.
Resultados obtenidos en el ensayo de bacterias luminiscentes y CADMIO (II)

| mg/L | Luminiscencia | | | t=15 min | | | t=30 min | | |
|-------|---------------|-------|-------|----------|------|-------|----------|------|--------|
| | t=0 | t=15 | t=30 | Icorr | %H | Gamma | Icorr | %H | Gamma |
| 50 | 1378 | 5,44 | 1,07 | 1421,8 | 99,6 | 260,4 | 1484,5 | 99,9 | 1386,4 |
| | 1049 | 7,17 | 1,34 | 1082,4 | 99,3 | 150,0 | 1130,1 | 99,9 | 842,3 |
| 25 | 969,2 | 42,48 | 5,98 | 1000,0 | 95,8 | 22,5 | 1044,1 | 99,4 | 173,6 |
| | 922,9 | 48,3 | 6,65 | 952,3 | 94,9 | 18,7 | 994,2 | 99,3 | 148,5 |
| 12,5 | 924,3 | 204,5 | 40,86 | 953,7 | 78,6 | 3,7 | 995,7 | 95,9 | 23,4 |
| | 955,8 | 101,4 | 19,03 | 986,2 | 89,7 | 8,7 | 1029,7 | 98,2 | 53,1 |
| 6,25 | 937,4 | 420,3 | 131 | 967,2 | 56,5 | 1,3 | 1009,8 | 87,0 | 6,7 |
| | 788,1 | 291,9 | 52,93 | 813,2 | 64,1 | 1,8 | 849,0 | 93,8 | 15,0 |
| 3,125 | 885,3 | 641,5 | 360,9 | 913,5 | 29,8 | 0,4 | 953,7 | 62,2 | 1,6 |
| | 1006 | 794,4 | 566,3 | 1038,0 | 23,5 | 0,3 | 1083,7 | 47,7 | 0,9 |
| 1,563 | 956,2 | 827,4 | 786,8 | 986,6 | 16,1 | 0,2 | 1030,1 | 23,6 | 0,3 |
| | 1039 | 887,6 | 873,5 | 1072,1 | 17,2 | 0,2 | 1119,3 | 22,0 | 0,3 |
| 0,781 | 950,3 | 948 | 1006 | 980,5 | 3,3 | 0,0 | 1023,7 | 1,7 | 0,0 |
| | 1053 | 1078 | 1105 | 1086,5 | 0,8 | 0,0 | 1134,4 | 2,6 | 0,0 |
| 0,391 | 1061 | 1119 | 1174 | 1094,8 | -2,2 | 0,0 | 1143,0 | -2,7 | 0,0 |
| | 1095 | 1145 | 1224 | 1129,8 | -1,3 | 0,0 | 1179,6 | -3,8 | 0,0 |
| 0,195 | 1016 | 614 | 618,6 | 1176,3 | -1,1 | 0,0 | 1228,1 | 0,5 | 0,0 |
| | 1089 | 662,5 | 727,4 | 1199,0 | 1,1 | 0,0 | 1251,8 | -0,5 | 0,0 |
| 0,0 | 1140 | 1189 | 1222 | 1421,8 | 99,6 | 260,4 | 1484,5 | 99,9 | 1386,4 |
| | 1162 | 1186 | 1258 | 1082,4 | 99,3 | 150,0 | 1130,1 | 99,9 | 842,3 |
| | | | | KF=1,032 | | | KF=1,077 | | |

Tabla VII.26.
Promedio de los valores de %H del ensayo de CADMIO (II)

| | mg/L cadmio | | | | | | | | | |
|----------|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| | 0,000 | 0,391 | 0,781 | 1,563 | 3,125 | 6,250 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | |
| t=15 min | 0,00 | -1,78 | 2,05 | 16,67 | 26,62 | 60,32 | 84,14 | 95,34 | 99,48 | Promedio |
| | 1,53 | 0,62 | 1,79 | 0,76 | 4,46 | 5,34 | 7,89 | 0,58 | 0,20 | DesvEst |
| t=30 min | 0,00 | -3,24 | 2,16 | 22,79 | 54,95 | 90,40 | 97,02 | 99,38 | 99,90 | Promedio |
| | 0,70 | 0,74 | 0,61 | 1,17 | 10,19 | 4,76 | 1,59 | 0,07 | 0,03 | DesvEst |

Variación del porcentaje de inhibición con la concentración de ensayo



Las concentraciones incluidas en la zona interior del gráfico muestran los valores de LC_{50} obtenidos mediante el método de interpolación gráfica

Tabla A VII.27.
Valores de $EC(p)$ calculados mediante interpolación gráfica

| <i>Cd (II) (mg/L)</i> | <i>t=15 min</i> | <i>t=30 min</i> |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| EC_5 | 1,126 | 1,004 |
| EC_{25} | 3,482 | 1,888 |
| EC_{50} | 4,809 | 2,683 |

5. OBJETIVOS DE CALIDAD DEL CADMIO (II). TABLAS DE CÁLCULO. RESULTADOS

Tabla A VII.28. Tabla resumen de los resultados de toxicidad más sensibles (Fact. Seg.=100)

| Resumen de resultados más sensibles de cada grupo de organismos | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos del presente estudio | | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos de toxicidad en agua de mar | | | Valor mínimo obtenidos a partir de la base de datos de toxicidad acuática | | |
|---|-----------------------------|---|-------|------|--|-------|------|---|-------|------|
| | | Nº datos | mg/L | x FS | Nº datos | mg/L | x FS | Nº datos | mg/L | x FS |
| Microalgas | NOEC (≤ 96 h) | 1 | 0,391 | | 1 | 0,391 | | 1 | 0,391 | |
| | LOEC (≤ 96 h) | 10 | 0,195 | | 10 | 0,195 | | 10 | 0,195 | |
| | IC ₅₀ (≤ 96 h) | 10 | 0,145 | | 15 | 0,105 | | 17 | 0,105 | |
| Crustáceos | NOEC (30 d) | | | | 1 | 0,018 | | 1 | 0,018 | |
| | LOEC (30 d) | | | | 1 | 0,039 | | 1 | 0,039 | |
| | EC ₅₀ (≤ 96 h) | 3 | 0,108 | | 7 | 0,108 | | 11 | 0,108 | |
| | EC ₅₀ (17 d) | | | | 2 | 0,039 | | 2 | 0,039 | |
| Bacterias | EC ₃₀ (≤ 30 min) | 2 | 2,683 | | 2 | 2,683 | | 2 | 2,683 | |
| Peces | NOEC (≤ 96 h) | | | | | | | 1 | 1,3 | |
| | NOEC (30 d) | | | | | | | 10 | 0,007 | |
| | LOEC (≤ 96 h) | | | | | | | 2 | 0,029 | |
| | LOEC (30 d) | | | | | | | 9 | 0,013 | |
| | EC ₅₀ (≤ 96 h) | | | | | | | 12 | 0,062 | |
| | EC ₅₀ (28 d) | | | | | | | 2 | 0,123 | |

Tabla A VII.29. Valores ecotoxicológicos obtenidos a partir de los valores L(E)C₅₀

| Valor guía obtenido a partir de los valores de L(E)C ₅₀ | Grupo de organismos | Tipo de Respuesta (Aguda o Crónica) | n _i , N | w _i = n _i /N | q _i = Conc- FS | w _i x q _i | Valor Guía = $\sum_{i=1}^n q_i w_i$ |
|--|---------------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------------------|---------------------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| Base de datos de toxicidad de este estudio | Algas | A | 10 | 0,7692 | 0,00145 | 0,0011 | 0,0013 mg/L Cd (II) |
| | Crustáceos | A | 3 | 0,2308 | 0,00108 | 0,0002 | |
| | Bacterias | A | 2 | 0,1538 | 0,002683 | 0,0004 | |
| | N total de datos | | | 15 | | | |
| Base de datos de toxicidad en agua de mar | Algas | A | 15 | 1,1538 | 0,00105 | 0,0012 | 0,0024 mg/L Cd (II) |
| | Crustáceos | A | 7 | 0,5385 | 0,00108 | 0,0006 | |
| | Crustáceos | C | 2 | 0,1538 | 0,0039 | 0,0006 | |
| | N total de datos | | | 24 | | | |
| Base de toxicidad acuática | Algas | A | 17 | 1,3077 | 0,00105 | 0,0014 | 0,0224 mg/L Cd (II) |
| | Crustáceos | A | 11 | 0,8462 | 0,00108 | 0,00091 | |
| | Crustáceos | C | 2 | 0,1538 | 0,0039 | 0,00060 | |
| | peces | A | 12 | 0,9231 | 0,00062 | 0,0006 | |
| | peces | C | 2 | 0,1538 | 0,123 | 0,0189 | |
| N total de datos | | | 44 | | | | |

Tabla A VII.30. Valores ecotoxicológicos obtenidos a partir de los valores NOEC/LOEC

| Valor guía obtenido a partir de los valores NOEC/LOEC | Grupo de organismos | Tipo de Respuesta (Aguda o Crónica) | n_i, N | $w_i = n_i/N$ | $q_i = \text{Conc. F S}$ | $w_i \times q_i$ | Valor Guía = $\sum_{i=1}^n q_i w_i$ |
|---|---------------------|-------------------------------------|----------|---------------|--------------------------|------------------|-------------------------------------|
| Base de datos de toxicidad de este estudio | Algas | A (NOEC) | 1 | 0,0909 | 0,00391 | 0,0004 | 0,0021 mg/L Cd (II) |
| | Algas | A (LOEC) | 10 | 0,9091 | 0,00195 | 0,0018 | |
| | N total de datos | | 11 | | | | |
| Base de datos de toxicidad en agua de mar | Algas | A (NOEC) | 1 | 0,0909 | 0,00391 | 0,0004 | 0,0026 mg/L Cd (II) |
| | Algas | A (LOEC) | 10 | 0,9091 | 0,00195 | 0,0018 | |
| | Crustáceos | C (NOEC) | 1 | 0,0909 | 0,0018 | 0,0002 | |
| | Crustáceos | C (LOEC) | 1 | 0,0909 | 0,0039 | 0,0004 | |
| N total de datos | | 13 | | | | | |
| Base de toxicidad acuática | Algas | A (NOEC) | 1 | 0,0909 | 0,00391 | 0,0004 | 0,0045 mg/L Cd (II) |
| | Algas | A (LOEC) | 10 | 0,9091 | 0,00195 | 0,0018 | |
| | Crustáceos | C (NOEC) | 1 | 0,0909 | 0,0018 | 0,0002 | |
| | Crustáceos | C (LOEC) | 1 | 0,0909 | 0,0039 | 0,0004 | |
| | peces | A (NOEC) | 1 | 0,0909 | 0,0013 | 0,0001 | |
| | peces | C (NOEC) | 10 | 0,9091 | 0,0007 | 0,0006 | |
| | peces | A (LOEC) | 2 | 0,1818 | 0,00029 | 0,0001 | |
| | peces | C (LOEC) | 9 | 0,8182 | 0,0013 | 0,0011 | |
| | Algas | A (NOEC) | 1 | 0,0909 | 0,00391 | 0,0004 | |
| N total de datos | | 36 | | | | | |

ANEXO VIII. ZINC (II)

1. DATOS DE REFERENCIA

1.1. PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS

- Suministro: Panreac
- Nombre del producto: Sulfato de zinc
- Número del producto: 7733-02-0
- Fórmula empírica: ZnSO_4
- Peso molecular: 161,44 g/mol
- Apariencia: polvo blanco

1.2. DATOS DE TOXICIDAD DE REFERENCIA

Las siguientes tablas muestran algunos resultados de toxicidad obtenidos de la bibliografía:

Tabla A VIII.1a.
Datos de toxicidad del Zinc (II) en algunos grupos de organismos. Algas

| <i>Especies</i> | <i>Medio</i> | <i>Tiempo Exposición (h)</i> | <i>Expresión de toxicidad</i> | <i>Zinc (II) (mg/L)</i> | <i>Referencia</i> |
|---------------------------------|--------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| <i>Anabaena variabilis</i> | Agua dulce | | EC50 | 3,4 | Moreno Garrido (1997) ¹ |
| <i>Chlorella saccharophyla</i> | Agua dulce | | EC50 | 0,72 | Moreno Garrido (1997) ¹ |
| <i>Navicula incerta</i> | Agua dulce | | EC50 | 9,8 | Moreno Garrido (1997) ¹ |
| <i>Nitzzia closterium</i> | Agua dulce | 72 | EC50 | 0,200 | Moreno Garrido (1997) ¹ |
| <i>Nannochloropsis gaditana</i> | Agua salada | 72 | EC50 | 3,900 | Moreno Garrido (1997) |

Tabla A VIII.1b.
Datos de toxicidad del Zinc (II) en algunos grupos de organismos. Crustáceos

| <i>Especies</i> | <i>Medio</i> | <i>Tiempo Exposición (h)</i> | <i>Expresión de toxicidad</i> | <i>Zinc (II) (mg/L)</i> | <i>Referencia</i> |
|---------------------------|--------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| <i>Ceriodaphnia dubia</i> | Agua dulce | 48 h | EC50 | 0,095 | Ramamoorthy (1995) ¹ |
| <i>Ceriodaphnia dubia</i> | Agua dulce | 48 h | EC50 | 0,36 | Ramamoorthy (1995) ¹ |
| <i>Ceriodaphnia dubia</i> | Agua dulce | 48 h | EC50 | 0,534 | Ramamoorthy (1995) ¹ |
| <i>Artemia salina</i> | Agua salada | 24 h | EC50 | 63,2 | Ramamoorthy (1995) ¹ |
| <i>Cancer magister</i> | Agua salada | 96 h | EC50 | 0,456 | Ramamoorthy (1995) ¹ |

Tabla A VIII.1c.
Datos de toxicidad del Zinc (II) en algunos grupos de organismos. Peces

| <i>Especies</i> | <i>Medio</i> | <i>Tiempo Exposición (h)</i> | <i>Expresión de toxicidad</i> | <i>Zinc (II) (mg/L)</i> | <i>Referencia</i> |
|--------------------------------|--------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------|-----------------------|
| <i>Agosia chrysogaster</i> | Agua dulce | 96 | NOEC | 0,5 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Agosia chrysogaster</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 0,79 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Agosia chrysogaster</i> | Agua dulce | 96 | LOEC | 2,4 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Ictalurus punctatus</i> | Agua dulce | 14 | EC50 | 8,2 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Leiostomus xanthurus</i> | Agua dulce | 14 | EC50 | 11 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Mugil auratus</i> | Agua dulce | 14 | EC50 | 8 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Noemacheilus barbatulus</i> | Agua dulce | 25 | EC50 | 2 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Noemacheilus barbatulus</i> | Agua dulce | 5 | EC50 | 2,5 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Noemacheilus barbatulus</i> | Agua dulce | 14 | EC50 | 3,5 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Noemacheilus barbatulus</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 3,5 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Noemacheilus barbatulus</i> | Agua dulce | 72 | EC50 | 4 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Noemacheilus barbatulus</i> | Agua dulce | 48 | EC50 | 6 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Noemacheilus barbatulus</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 12 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Noemacheilus barbatulus</i> | Agua dulce | 24 | EC50 | 15 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 6 | EC50 | 0,6 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 45 | NOEC | 10 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Pimephales promelas</i> | Agua dulce | 45 | LOEC | 15 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 31 | NOEC | 0,096 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 21 | EC50 | 0,35 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 31 | LOEC | 0,352 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 5 | EC50 | 4,76 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 15 | EC50 | 6 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 8 | EC50 | 9 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 15 | NOEC | 15 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo gairdneri</i> | Agua dulce | 15 | LOEC | 20 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo salar</i> | Agua dulce | 21 | EC50 | 0,34 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo salar</i> | Agua dulce | 21 | EC50 | 0,51 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo salar</i> | Agua dulce | 21 | EC50 | 1,45 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo salar</i> | Agua dulce | 21 | EC50 | 1,46 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo salar</i> | Agua dulce | 21 | EC50 | 1,6 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salmo salar</i> | Agua dulce | 6 | EC50 | 3,6 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 60 | NOEC | 0,53 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 60 | NOEC | 0,7 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 140 | NOEC | 0,7 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 60 | LOEC | 1,4 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 140 | LOEC | 1,4 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Salvenilus namaycish</i> | Agua dulce | 96 | EC50 | 2 | ECETOC ⁽¹⁾ |
| <i>Parophrys vetulus</i> | Agua salada | 96 | EC50 | 14,5 | ECETOC ⁽¹⁾ |

¹ Referencias recogidas en los documentos indicados pero no pertenecientes a estos autores

2. ENSAYOS DE MICROALGAS MARINAS

RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Volumen de los viales de ensayo: 15 mL
- Volumen de solución de ensayo: 4 mL
- Agua de dilución: mezcla acetona+agua de mar sintética (acetona al 1,25% (v/v))
- Medio nutriente adicional: si, medio f/2 sin AEDT-Na₂
- Temperatura de ensayo: 20 ± 0,1 °C
- Iluminación: constante, 11000 lux
- Aireación: diaria -de forma manual-
- Duración del ensayo: 10 días (+ 10 para el estudio de la concentración alguistática y alguicida)
- Medidas de biomasa: turbidez, a $\lambda = 690$ nm

MICROALGAS ENSAYADAS

- *Nannochloropsis gaditana*
- *Isochrysis galbana*
- *Dunaliella salina*
- *Chaetoceros gracilis*
- *Tetraselmis chuii*

RESULTADOS OBTENIDOS

- Valores de biomasa (Abs, 690 nm) de cada tratamiento
- Valores experimentales de NOEC y LOEC
- Valores experimentales de inhibición calculados a partir del ICp programa (Las indicaciones inferiores de las tablas (*) y (**)) están referidas a indicaciones realizadas por el programa
- Concentraciones alguistáticas y alguicidas experimentales

2.1. Nannochloropsis gaditana

Tabla A VIII.2.

Evolución de la biomasa de Nannochloropsis gaditana. Ensayo de ZINC (II).

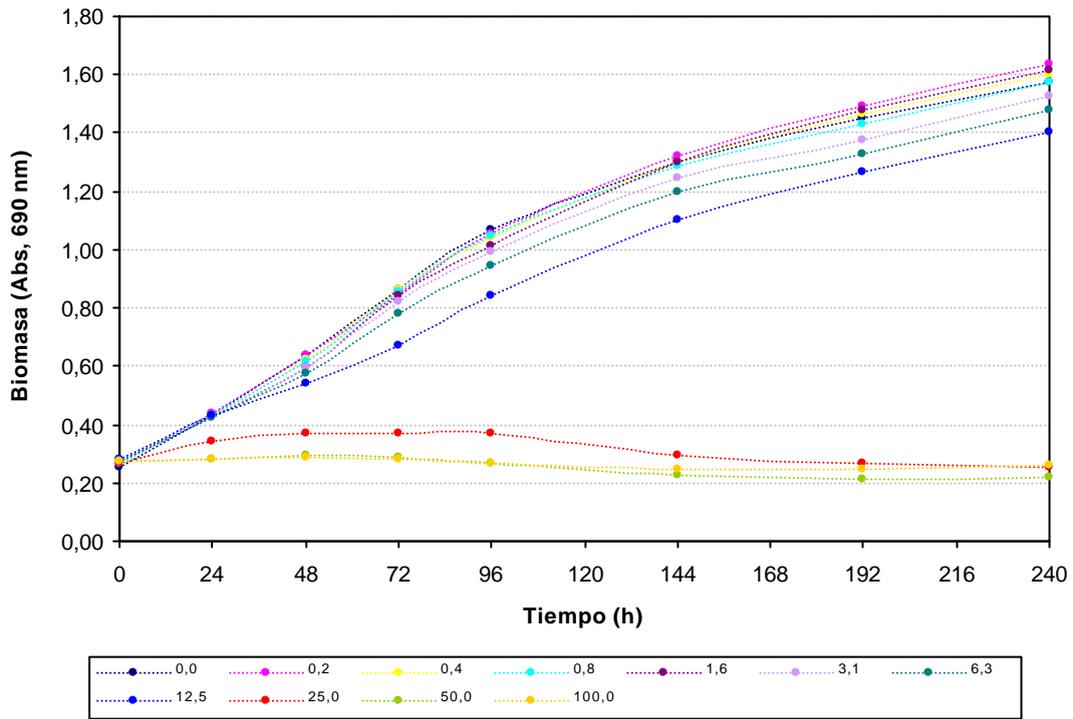
| | | <i>N. gaditana</i>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | Abs´ = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | |
|-------|------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|--------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| t(d) | t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| 0,0 | | 0,252 | 0,458 | 0,687 | 0,857 | 1,057 | | | | 0,000 | 0,206 | 0,435 | 0,605 | 0,805 | | | |
| | | 0,259 | 0,428 | 0,631 | 0,857 | 1,050 | 1,298 | 1,452 | 1,575 | 0,000 | 0,169 | 0,372 | 0,598 | 0,791 | 1,039 | 1,193 | 1,316 |
| | | 0,246 | 0,399 | 0,591 | 0,868 | 1,105 | | | | 0,000 | 0,153 | 0,345 | 0,622 | 0,859 | | | |
| 0,2 | | 0,255 | 0,451 | 0,690 | 0,866 | 1,040 | | | | 0,000 | 0,196 | 0,435 | 0,611 | 0,785 | | | |
| | | 0,273 | 0,441 | 0,630 | 0,869 | 1,056 | 1,324 | 1,490 | 1,634 | 0,000 | 0,168 | 0,357 | 0,596 | 0,783 | 1,051 | 1,217 | 1,361 |
| | | 0,272 | 0,416 | 0,584 | 0,803 | 1,065 | | | | 0,000 | 0,144 | 0,312 | 0,531 | 0,793 | | | |
| 0,4 | | 0,271 | 0,467 | 0,679 | 0,882 | 1,070 | | | | 0,000 | 0,196 | 0,408 | 0,611 | 0,799 | | | |
| | | 0,257 | 0,419 | 0,608 | 0,860 | 1,026 | 1,298 | 1,465 | 1,600 | 0,000 | 0,162 | 0,351 | 0,603 | 0,769 | 1,041 | 1,208 | 1,343 |
| | | 0,272 | 0,399 | 0,574 | 0,842 | 1,015 | | | | 0,000 | 0,127 | 0,302 | 0,570 | 0,743 | | | |
| 0,8 | | 0,269 | 0,468 | 0,674 | 0,871 | 1,056 | | | | 0,000 | 0,199 | 0,405 | 0,602 | 0,787 | | | |
| | | 0,263 | 0,413 | 0,603 | 0,840 | 1,017 | 1,289 | 1,432 | 1,573 | 0,000 | 0,150 | 0,340 | 0,577 | 0,754 | 1,026 | 1,169 | 1,310 |
| | | 0,271 | 0,404 | 0,566 | 0,857 | 1,075 | | | | 0,000 | 0,133 | 0,295 | 0,586 | 0,804 | | | |
| 1,6 | | 0,281 | 0,477 | 0,671 | 0,866 | 1,052 | | | | 0,000 | 0,196 | 0,390 | 0,585 | 0,771 | | | |
| | | 0,278 | 0,429 | 0,605 | 0,866 | 1,044 | 1,300 | 1,476 | 1,615 | 0,000 | 0,151 | 0,327 | 0,588 | 0,766 | 1,022 | 1,198 | 1,337 |
| | | 0,256 | 0,367 | 0,517 | 0,799 | 0,941 | | | | 0,000 | 0,111 | 0,261 | 0,543 | 0,685 | | | |
| 3,1 | | 0,289 | 0,471 | 0,655 | 0,860 | 1,030 | | | | 0,000 | 0,182 | 0,366 | 0,571 | 0,741 | | | |
| | | 0,260 | 0,413 | 0,593 | 0,814 | 1,002 | 1,244 | 1,377 | 1,527 | 0,000 | 0,153 | 0,333 | 0,554 | 0,742 | 0,984 | 1,117 | 1,267 |
| | | 0,267 | 0,391 | 0,541 | 0,794 | 0,947 | | | | 0,000 | 0,124 | 0,274 | 0,527 | 0,680 | | | |
| 6,3 | | 0,293 | 0,466 | 0,637 | 0,814 | 0,992 | | | | 0,000 | 0,173 | 0,344 | 0,521 | 0,699 | | | |
| | | 0,258 | 0,413 | 0,574 | 0,792 | 0,937 | 1,198 | 1,331 | 1,477 | 0,000 | 0,155 | 0,316 | 0,534 | 0,679 | 0,940 | 1,073 | 1,219 |
| | | 0,269 | 0,392 | 0,519 | 0,732 | 0,898 | | | | 0,000 | 0,123 | 0,250 | 0,463 | 0,629 | | | |
| 12,5 | | 0,261 | 0,436 | 0,557 | 0,684 | 0,916 | | | | 0,000 | 0,175 | 0,296 | 0,423 | 0,655 | | | |
| | | 0,277 | 0,437 | 0,551 | 0,676 | 0,812 | 1,100 | 1,268 | 1,405 | 0,000 | 0,160 | 0,274 | 0,399 | 0,535 | 0,823 | 0,991 | 1,128 |
| | | 0,294 | 0,430 | 0,519 | 0,661 | 0,793 | | | | 0,000 | 0,136 | 0,225 | 0,367 | 0,499 | | | |
| 25,0 | | 0,262 | 0,342 | 0,375 | 0,372 | 0,373 | | | | 0,000 | 0,080 | 0,113 | 0,110 | 0,111 | | | |
| | | 0,255 | 0,326 | 0,357 | 0,365 | 0,370 | 0,296 | 0,267 | 0,251 | 0,000 | 0,071 | 0,102 | 0,110 | 0,115 | 0,041 | 0,012 | -0,004 |
| | | 0,288 | 0,349 | 0,384 | 0,371 | 0,363 | | | | 0,000 | 0,061 | 0,096 | 0,083 | 0,075 | | | |
| 50,0 | | 0,276 | 0,282 | 0,297 | 0,282 | 0,263 | | | | 0,000 | 0,006 | 0,021 | 0,006 | -0,013 | | | |
| | | 0,251 | 0,262 | 0,277 | 0,272 | 0,259 | 0,224 | 0,213 | 0,219 | 0,000 | 0,011 | 0,026 | 0,021 | 0,008 | -0,027 | -0,038 | -0,032 |
| | | 0,288 | 0,295 | 0,314 | 0,301 | 0,286 | | | | 0,000 | 0,007 | 0,026 | 0,013 | -0,002 | | | |
| 100,0 | | 0,261 | 0,252 | 0,279 | 0,265 | 0,241 | | | | 0,000 | -0,009 | 0,018 | 0,004 | -0,020 | | | |
| | | 0,265 | 0,275 | 0,291 | 0,282 | 0,258 | 0,247 | 0,245 | 0,259 | 0,000 | 0,010 | 0,026 | 0,017 | -0,007 | -0,018 | -0,020 | -0,006 |
| | | 0,295 | 0,310 | 0,300 | 0,296 | 0,301 | | | | 0,000 | 0,015 | 0,005 | 0,001 | 0,006 | | | |

Tabla A VIII.3.

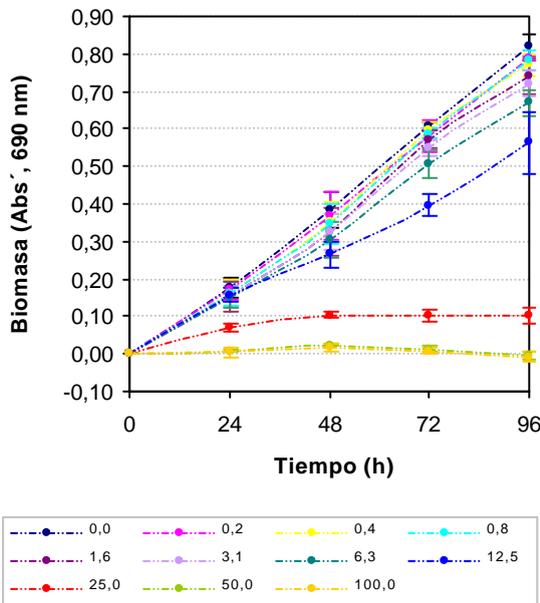
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs´)

| t (h) | mg/L ZINC (II) | | | | | | | | | | | Promedio | DesvEst |
|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--------|--------|----------|---------|
| | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,1 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | | |
| 24 | 0,176 | 0,169 | 0,162 | 0,161 | 0,153 | 0,153 | 0,150 | 0,157 | 0,071 | 0,008 | 0,005 | Promedio | DesvEst |
| | 0,027 | 0,026 | 0,035 | 0,034 | 0,043 | 0,029 | 0,025 | 0,020 | 0,010 | 0,003 | 0,013 | | |
| 48 | 0,384 | 0,368 | 0,354 | 0,347 | 0,326 | 0,324 | 0,303 | 0,265 | 0,104 | 0,024 | 0,016 | Promedio | DesvEst |
| | 0,046 | 0,062 | 0,053 | 0,055 | 0,065 | 0,047 | 0,048 | 0,036 | 0,009 | 0,003 | 0,011 | | |
| 72 | 0,608 | 0,556 | 0,595 | 0,588 | 0,556 | 0,551 | 0,506 | 0,396 | 0,101 | 0,013 | 0,007 | Promedio | DesvEst |
| | 0,012 | 0,082 | 0,022 | 0,013 | 0,052 | 0,022 | 0,038 | 0,028 | 0,016 | 0,008 | 0,009 | | |
| 96 | 0,818 | 0,787 | 0,770 | 0,782 | 0,741 | 0,721 | 0,669 | 0,563 | 0,100 | -0,002 | -0,007 | Promedio | DesvEst |
| | 0,036 | 0,005 | 0,028 | 0,025 | 0,048 | 0,036 | 0,036 | 0,082 | 0,022 | 0,011 | 0,013 | | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

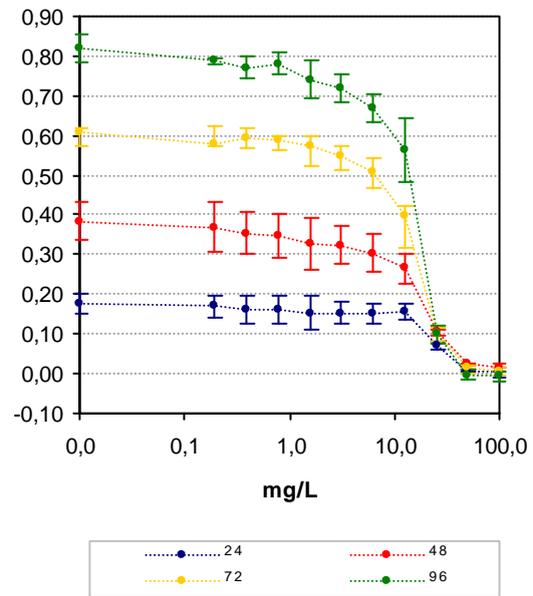


Tabla A VIII.4.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *N. gaditana* expuesta a diferentes concentraciones de ZINC (II).

| <i>N. gaditana</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|--|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,967 | | 0,938 | | 0,946 | | 0,966 | |
| B calculado | 11,22 | | 16,31 | | 9,68 | | 15,12 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L Zn (II) | t _i | p |
| 0,2 | 0,31 | 0,38714 | 0,44 | 0,36936 | 1,48 | 0,16000 | 1,04 | 0,10458 |
| 0,4 | 0,66 | 0,30107 | 0,83 | 0,24830 | 0,70 | 0,19861 | 1,59 | 0,07100 |
| 0,8 | 0,71 | 0,28826 | 1,02 | 0,21010 | 1,02 | 0,06084 | 1,21 | 0,11118 |
| 1,6 | 1,08 | 0,23407 | 1,59 | 0,13707 | 1,86 | 0,04404 | 2,57 | 0,04451 |
| 3,1 | 1,06 | 0,18648 | 1,63 | 0,09518 | 2,95 (*) | 0,00852 | 3,22 (*) | 0,01444 |
| 6,3 | 1,19 | 0,14877 | 2,21 | 0,05232 | 5,23 | 0,00559 | 4,94 | 0,00353 |
| 12,5 | 0,88 | 0,19113 | 3,25 (*) | 0,01237 | 10,84 | 0,00014 | 8,45 | 0,00386 |
| 25,0 | 4,87 (*) | 0,00159 | 7,67 | 0,00025 | 25,95 | 0,00000 | 23,75 | 0,00000 |
| 50,0 | 7,77 | 0,00022 | 9,84 | 0,00009 | 30,43 | 0,00000 | 27,15 | 0,00000 |
| 100,0 | 7,89 | 0,00030 | 10,06 | 0,00009 | 30,74 | 0,00000 | 27,30 | 0,00000 |
| MSD | 0,057 | | 0,097 | | 0,052 | | 0,080 | |
| % reducción | 32,44 | | 25,14 | | 8,49 | | 9,75 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola) | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,932 | | 0,918 | | 0,925 | | 0,930 | | 0,940 | | 0,946 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 3,64 | | 4,25 | | 4,26 | | 4,99 | | 7,59 | | 9,68 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L Zn (II) | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,2 | 1,43 | 0,16 | 1,31 | 0,16 | 1,30 | 0,16 | 1,36 | 0,16 | 1,42 | 0,16 | 1,48 | 0,16 |
| 0,4 | 0,67 | 0,20 | 0,62 | 0,20 | 0,61 | 0,20 | 0,64 | 0,20 | 0,67 | 0,20 | 0,70 | 0,20 |
| 0,8 | 0,98 | 0,06 | 0,90 | 0,06 | 0,90 | 0,06 | 0,93 | 0,06 | 0,98 | 0,06 | 1,02 | 0,06 |
| 1,6 | 1,79 | 0,04 | 1,64 | 0,04 | 1,63 | 0,04 | 1,70 | 0,04 | 1,78 | 0,04 | 1,86 | 0,04 |
| 3,1 | 2,84(*) | 0,01 | 2,60(*) | 0,01 | 2,59(*) | 0,01 | 2,70(*) | 0,01 | 2,83(*) | 0,01 | 2,95(*) | 0,01 |
| 6,3 | --- | --- | 4,62 | 0,01 | 4,60 | 0,01 | 4,78 | 0,01 | 5,02 | 0,01 | 5,23 | 0,01 |
| 12,5 | --- | --- | --- | --- | 9,53 | 0,00 | 9,91 | 0,00 | 10,40 | 0,00 | 10,84 | 0,00 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 23,71 | 0,00 | 24,88 | 0,00 | 25,95 | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 29,18 | 0,00 | 30,43 | 0,00 |
| 100,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 30,74 | 0,00 |
| MSD | 0,051 | | 0,056 | | 0,057 | | 0,055 | | 0,053 | | 0,052 | |
| % reducción | 8,35 | | 9,21 | | 9,36 | | 9,07 | | 8,71 | | 8,49 | |

Tabla A VIII.5.
Valores de ICp del ensayo de *N. gaditana* y Zn (II) a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de Zn (II) estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 1,2634 | -1,0746 | 0,1501 | 1,2222 | 2,4128 | 3,6770 | 0,6414 |
| | 25 | 9,0853 | 4,8046 | 7,0469 | 9,0167 | 10,3027 | 11,6419 | 0,7802 |
| | 50 | 16,4010 | 14,5885 | 15,5379 | 16,3923 | 17,1152 | 17,9009 | 0,4170 |
| | 75 | 22,8379 | 21,6735 | 22,2834 | 22,8326 | 23,3130 | 23,8356 | 0,2813 |
| | 95 | 45,1283 | 41,5018 | 43,4014 | 45,1916 | 47,0573 | 49,1792 | 49,1792 |
| 96 | 5 | 0,3658 | -1,4700 | 0,1216 | 0,6988 | 2,0601 | 3,9238 | 0,5564 |
| | 25 | 9,5077 | 4,1215 | 6,9428 | 9,7425 | 13,0465 | 16,9392 | 1,6880 |
| | 50 | 16,6562 | 13,6937 | 15,2455 | 16,6079 | 17,8708 | 19,2070 | 0,7239 |
| | 75 | 22,1834 | 20,7355 | 21,4940 | 22,1658 | 22,8162 | 23,5123 | 0,3414 |
| | 95 | 39,9204 | 33,3664 | 36,7389 | 36,7389 | 41,7918 | 43,9775 | 1,1832 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

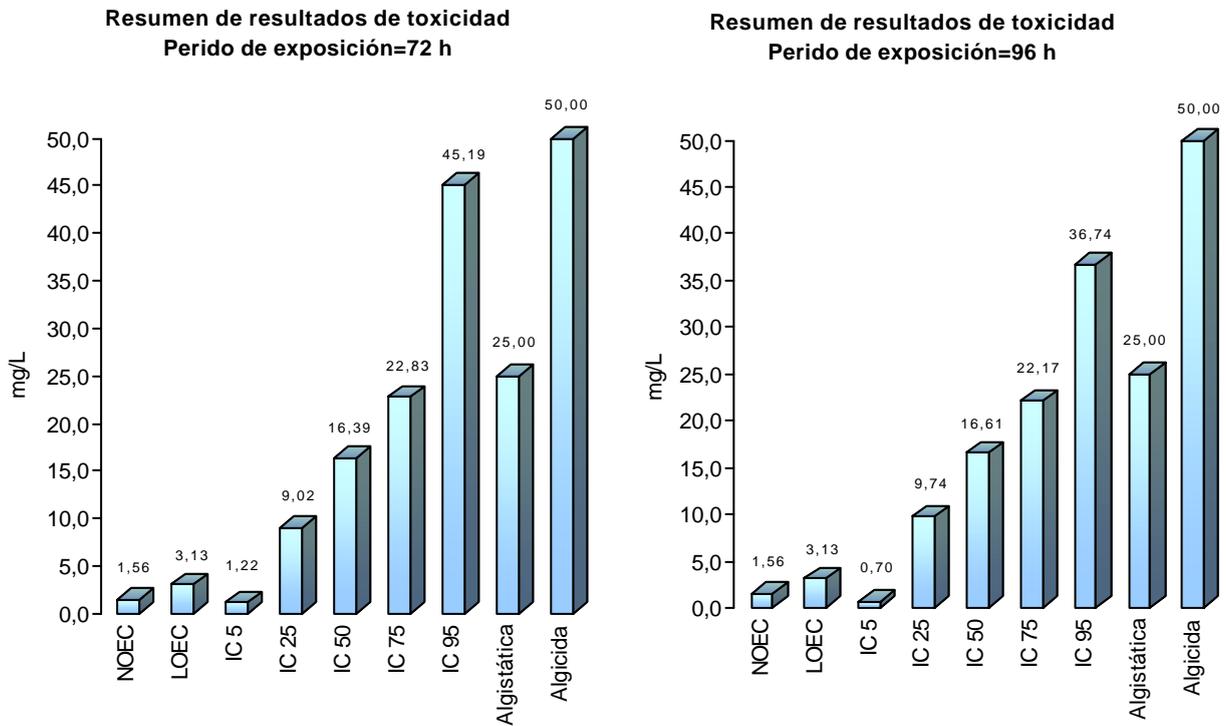
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUCIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de Zn (II) ensayadas con *N. gaditana* (100, 50, 25 y 12,5) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo se observó un aumento en la biomasa del vial correspondiente al estudio de 12,5 y 25 mg/L. Por lo tanto:

- Concentración alguistática= 25 mg/L
- Concentración algucida= 50 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del zinc y *N. gaditana*.



2.2. Isochrysis galbana

Tabla A VIII.6.

Evolución de la biomasa de Isochrysis galbana. Ensayo de ZINC (II).

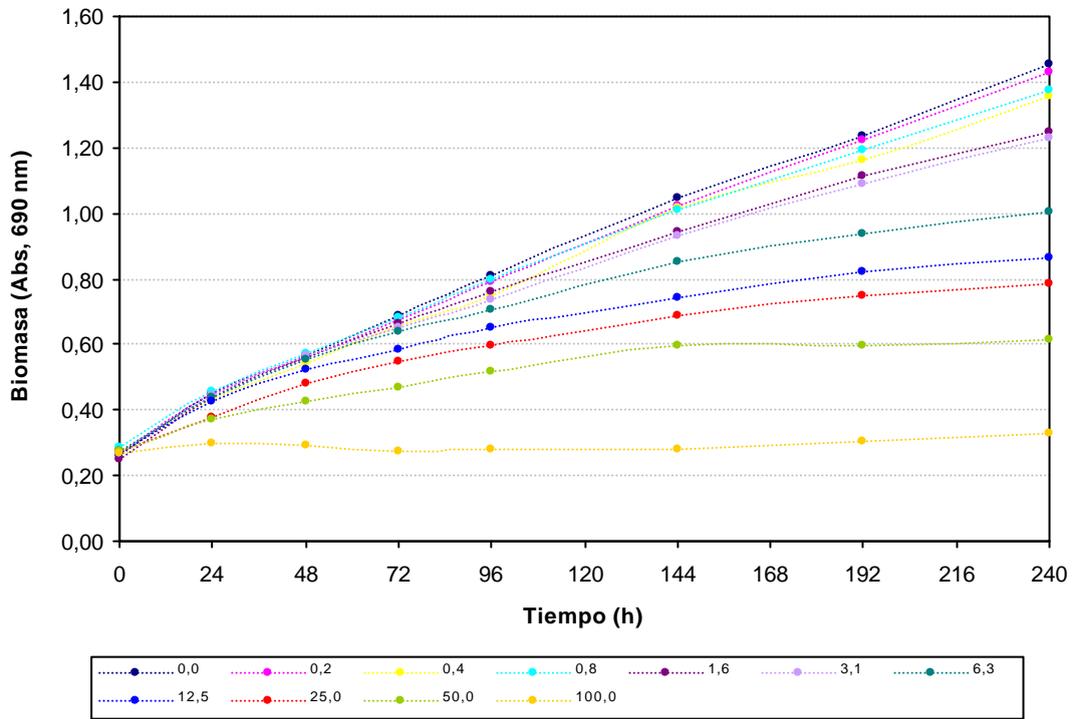
| <i>I. galbana</i>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | Abs´ = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------------------------------|-------|-------|--------|-------|-------|-------|-------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| 0,0 | 0,270 | 0,452 | 0,563 | 0,668 | 0,789 | | | | 0,000 | 0,182 | 0,293 | 0,398 | 0,519 | | | | |
| | 0,260 | 0,439 | 0,545 | 0,650 | 0,773 | 1,045 | 1,234 | 1,456 | 0,000 | 0,179 | 0,285 | 0,390 | 0,513 | 0,785 | 0,974 | 1,196 | |
| | 0,258 | 0,464 | 0,590 | 0,749 | 0,857 | | | | 0,000 | 0,206 | 0,332 | 0,491 | 0,599 | | | | |
| 0,2 | 0,258 | 0,449 | 0,561 | 0,670 | 0,785 | | | | 0,000 | 0,191 | 0,303 | 0,412 | 0,527 | | | | |
| | 0,283 | 0,445 | 0,550 | 0,662 | 0,775 | 1,023 | 1,221 | 1,430 | 0,000 | 0,162 | 0,267 | 0,379 | 0,492 | 0,740 | 0,938 | 1,147 | |
| | 0,255 | 0,449 | 0,571 | 0,688 | 0,805 | | | | 0,000 | 0,194 | 0,316 | 0,433 | 0,550 | | | | |
| 0,4 | 0,268 | 0,428 | 0,541 | 0,666 | 0,726 | | | | 0,000 | 0,160 | 0,273 | 0,398 | 0,458 | | | | |
| | 0,269 | 0,437 | 0,536 | 0,649 | 0,751 | 1,013 | 1,160 | 1,356 | 0,000 | 0,168 | 0,267 | 0,380 | 0,482 | 0,744 | 0,891 | 1,087 | |
| | 0,285 | 0,439 | 0,544 | 0,653 | 0,769 | | | | 0,000 | 0,154 | 0,259 | 0,368 | 0,484 | | | | |
| 0,8 | 0,282 | 0,467 | 0,574 | 0,702 | 0,806 | | | | 0,000 | 0,185 | 0,292 | 0,420 | 0,524 | | | | |
| | 0,305 | 0,457 | 0,573 | 0,675 | 0,784 | 1,010 | 1,193 | 1,376 | 0,000 | 0,152 | 0,268 | 0,370 | 0,479 | 0,705 | 0,888 | 1,071 | |
| | 0,270 | 0,448 | 0,573 | 0,665 | 0,802 | | | | 0,000 | 0,178 | 0,303 | 0,395 | 0,532 | | | | |
| 1,6 | 0,248 | 0,447 | 0,569 | 0,685 | 0,787 | | | | 0,000 | 0,199 | 0,321 | 0,437 | 0,539 | | | | |
| | 0,256 | 0,425 | 0,529 | 0,622 | 0,714 | 0,941 | 1,111 | 1,245 | 0,000 | 0,169 | 0,273 | 0,366 | 0,458 | 0,685 | 0,855 | 0,989 | |
| | 0,251 | 0,439 | 0,576 | 0,675 | 0,782 | | | | 0,000 | 0,188 | 0,325 | 0,424 | 0,531 | | | | |
| 3,1 | 0,272 | 0,426 | 0,530 | 0,619 | 0,699 | | | | 0,000 | 0,154 | 0,258 | 0,347 | 0,427 | | | | |
| | 0,282 | 0,453 | 0,581 | 0,669 | 0,751 | 0,930 | 1,087 | 1,226 | 0,000 | 0,171 | 0,299 | 0,387 | 0,469 | 0,648 | 0,805 | 0,944 | |
| | 0,255 | 0,452 | 0,582 | 0,664 | 0,753 | | | | 0,000 | 0,197 | 0,327 | 0,409 | 0,498 | | | | |
| 6,3 | 0,287 | 0,447 | 0,544 | 0,627 | 0,702 | | | | 0,000 | 0,160 | 0,257 | 0,340 | 0,415 | | | | |
| | 0,259 | 0,448 | 0,559 | 0,656 | 0,716 | 0,850 | 0,936 | 1,001 | 0,000 | 0,189 | 0,300 | 0,397 | 0,457 | 0,591 | 0,677 | 0,742 | |
| | 0,284 | 0,426 | 0,553 | 0,634 | 0,696 | | | | 0,000 | 0,142 | 0,269 | 0,350 | 0,412 | | | | |
| 12,5 | 0,253 | 0,430 | 0,530 | 0,578 | 0,701 | | | | 0,000 | 0,177 | 0,277 | 0,325 | 0,448 | | | | |
| | 0,265 | 0,419 | 0,505 | 0,569 | 0,612 | 0,743 | 0,821 | 0,864 | 0,000 | 0,154 | 0,240 | 0,304 | 0,347 | 0,478 | 0,556 | 0,599 | |
| | 0,277 | 0,420 | 0,529 | 0,603 | 0,643 | | | | 0,000 | 0,143 | 0,252 | 0,326 | 0,366 | | | | |
| 25,0 | 0,280 | 0,391 | 0,485 | 0,579 | 0,626 | | | | 0,000 | 0,111 | 0,205 | 0,299 | 0,346 | | | | |
| | 0,274 | 0,389 | 0,488 | 0,540 | 0,589 | 0,689 | 0,749 | 0,782 | 0,000 | 0,115 | 0,214 | 0,266 | 0,315 | 0,415 | 0,475 | 0,508 | |
| | 0,268 | 0,360 | 0,460 | 0,527 | 0,572 | | | | 0,000 | 0,092 | 0,192 | 0,259 | 0,304 | | | | |
| 50,0 | 0,268 | 0,366 | 0,431 | 0,466 | 0,530 | | | | 0,000 | 0,098 | 0,163 | 0,198 | 0,262 | | | | |
| | 0,281 | 0,383 | 0,435 | 0,487 | 0,524 | 0,596 | 0,594 | 0,613 | 0,000 | 0,102 | 0,154 | 0,206 | 0,243 | 0,315 | 0,313 | 0,332 | |
| | 0,273 | 0,358 | 0,415 | 0,461 | 0,502 | | | | 0,000 | 0,085 | 0,142 | 0,188 | 0,229 | | | | |
| 100,0 | 0,277 | 0,301 | 0,283 | 0,264 | 0,285 | | | | 0,000 | 0,024 | 0,006 | -0,013 | 0,008 | | | | |
| | 0,261 | 0,288 | 0,287 | 0,248 | 0,264 | 0,277 | 0,307 | 0,327 | 0,000 | 0,027 | 0,026 | -0,013 | 0,003 | 0,016 | 0,046 | 0,066 | |
| | 0,267 | 0,302 | 0,313 | 0,315 | 0,294 | | | | 0,000 | 0,035 | 0,046 | 0,048 | 0,027 | | | | |

Tabla A VIII.7.

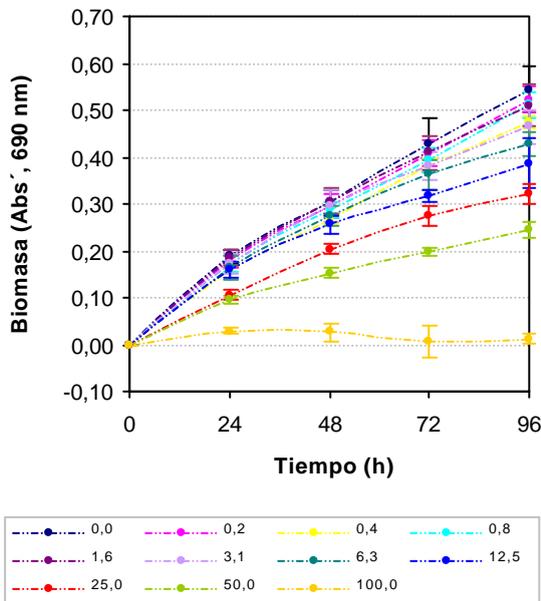
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs´)

| t (h) | mg/L ZINC (II) | | | | | | | | | | | Promedio |
|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,1 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | |
| 24 | 0,189 | 0,182 | 0,161 | 0,172 | 0,185 | 0,174 | 0,164 | 0,158 | 0,106 | 0,095 | 0,029 | DesvEst |
| | 0,015 | 0,018 | 0,007 | 0,017 | 0,015 | 0,022 | 0,024 | 0,017 | 0,012 | 0,009 | 0,006 | |
| 48 | 0,303 | 0,295 | 0,266 | 0,288 | 0,306 | 0,295 | 0,275 | 0,256 | 0,204 | 0,153 | 0,026 | DesvEst |
| | 0,025 | 0,025 | 0,007 | 0,018 | 0,029 | 0,035 | 0,022 | 0,019 | 0,011 | 0,011 | 0,020 | |
| 72 | 0,426 | 0,408 | 0,382 | 0,395 | 0,409 | 0,381 | 0,362 | 0,318 | 0,275 | 0,197 | 0,007 | DesvEst |
| | 0,056 | 0,027 | 0,015 | 0,025 | 0,038 | 0,031 | 0,030 | 0,012 | 0,021 | 0,009 | 0,035 | |
| 96 | 0,544 | 0,523 | 0,475 | 0,512 | 0,509 | 0,465 | 0,428 | 0,387 | 0,322 | 0,245 | 0,013 | DesvEst |
| | 0,048 | 0,029 | 0,014 | 0,029 | 0,045 | 0,036 | 0,025 | 0,054 | 0,022 | 0,017 | 0,013 | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

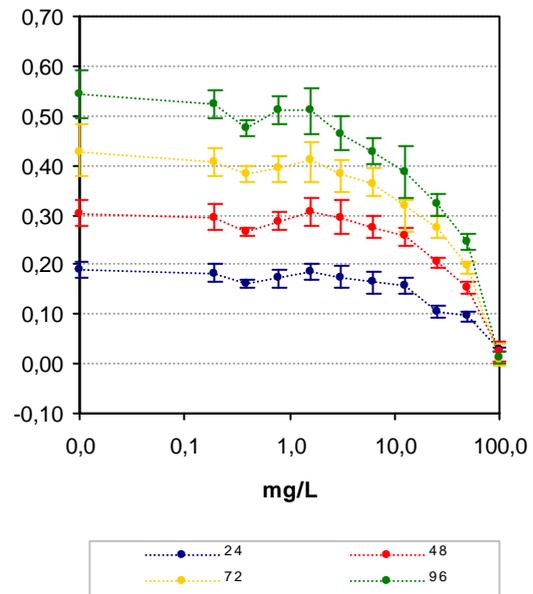


Tabla A VIII.8.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *I. galbana* expuesta a diferentes concentraciones de ZINC (II).

| <i>I. galbana</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,966 | | 0,975 | | 0,974 | | 0,978 | |
| B calculado | 5,64 | | 6,24 | | 8,05 | | 7,22 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L Zn (II) | t _i | p |
| 0,2 | 0,52 | 0,32136 | 0,45 | 0,35896 | 0,74 | 0,31880 | 0,77 | 0,27939 |
| 0,4 | 2,21 | 0,02005 | 2,09 | 0,03505 | 1,80 | 0,12854 | 2,57 | 0,03786 |
| 0,8 | 1,35 | 0,12943 | 0,89 | 0,21448 | 1,27 | 0,21355 | 1,19 | 0,18867 |
| 1,6 | 0,29 | 0,38970 | -0,17 | 0,44937 | 0,70 | 0,34015 | 1,28 | 0,20783 |
| 3,1 | 1,17 | 0,18900 | 0,49 | 0,37190 | 1,84 | 0,14469 | 2,94 (*) | 0,04207 |
| 6,3 | 1,98 | 0,09578 | 1,58 | 0,11084 | 2,60 | 0,07881 | 4,31 | 0,01046 |
| 12,5 | 2,42 | 0,03906 | 2,66 (*) | 0,03037 | 4,38 (*) | 0,01564 | 5,84 | 0,00982 |
| 25,0 | 6,48 (*) | 0,00086 | 5,63 | 0,00164 | 6,15 | 0,00597 | 8,28 | 0,00094 |
| 50,0 | 7,34 | 0,00035 | 8,49 | 0,00034 | 9,29 | 0,00111 | 11,15 | 0,00026 |
| 100,0 | 12,52 | 0,00003 | 15,67 | 0,00006 | 17,00 | 0,00020 | 19,79 | 0,00003 |
| MSD | 0,034 | | 0,047 | | 0,065 | | 0,071 | |
| % reducción | 17,89 | | 15,41 | | 15,26 | | 13,03 | |
| <p><i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola).</p> | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|------|-------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,948 | | 0,959 | | 0,968 | | 0,970 | | 0,976 | | 0,974 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 3,05 | | 3,10 | | 4,95 | | 5,38 | | 7,95 | | 8,05 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L Zn (II) | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,2 | 0,65 | 0,32 | 0,66 | 0,32 | 0,70 | 0,32 | 0,72 | 0,32 | 0,76 | 0,32 | 0,74 | 0,32 |
| 0,4 | 1,57 | 0,13 | 1,60 | 0,13 | 1,69 | 0,13 | 1,75 | 0,13 | 1,83 | 0,13 | 1,80 | 0,13 |
| 0,8 | 1,11 | 0,21 | 1,13 | 0,21 | 1,20 | 0,21 | 1,23 | 0,21 | 1,29 | 0,21 | 1,27 | 0,21 |
| 1,6 | 0,61 | 0,34 | 0,62 | 0,34 | 0,66 | 0,34 | 0,68 | 0,34 | 0,72 | 0,34 | 0,70 | 0,34 |
| 3,1 | 1,61 | 0,14 | 1,63 | 0,14 | 1,73 | 0,14 | 1,79 | 0,14 | 1,87 | 0,14 | 1,84 | 0,14 |
| 6,3 | --- | --- | 2,31 | 0,08 | 2,44 | 0,08 | 2,52 | 0,08 | 2,65(*) | 0,08 | 2,60 | 0,08 |
| 12,5 | --- | --- | --- | --- | 4,12(*) | 0,02 | 4,25(*) | 0,02 | 4,46 | 0,02 | 4,38(*) | 0,02 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 5,97 | 0,01 | 6,27 | 0,01 | 6,15 | 0,01 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 9,46 | 0,00 | 9,29 | 0,00 |
| 100,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 17,00 | 0,00 |
| MSD | 0,071 | | 0,070 | | 0,067 | | 0,065 | | 0,063 | | 0,065 | |
| % reducción | 16,54 | | 16,47 | | 15,74 | | 15,36 | | 14,76 | | 15,26 | |

Tabla A VIII.9.
Valores de ICp del ensayo de *I. galbana* y Zn (II) a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de Zn (II) estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,2412 | -0,1307 | 0,0641 | 1,1322 | 5,7099 | 11,7256 | 1,6260 |
| | 25 | 12,2988 | -3,8297 | 4,6186 | 12,8037 | 21,0385 | 30,6522 | 4,1998 |
| | 50 | 44,8815 | 25,5600 | 35,6808 | 44,4978 | 50,7623 | 57,2312 | 4,0980 |
| | 75 | 73,8816 | 65,3430 | 69,8156 | 74,2485 | 79,2457 | 85,1463 | 2,3477 |
| | 95 | 96,3202 | (***) | | | | | |
| 96 | 5 | 0,2473 | -0,1016 | 0,0811 | 0,5674 | 2,3414 | 4,6450 | 0,7326 |
| | 25 | 9,3369 | -2,4954 | 3,7024 | 9,6469 | 16,4906 | 24,3596 | 3,4193 |
| | 50 | 41,1797 | 23,2500 | 32,6417 | 41,0163 | 48,6378 | 56,8418 | 4,0629 |
| | 75 | 73,4375 | 66,2880 | 70,0330 | 73,2845 | 76,1844 | 79,2060 | 1,5432 |
| | 95 | 96,8714 | (**) | (**) | 96,8188 | (**) | (**) | 1,1819 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

(**) No es posible calcular límites de confianza

(***) No es posible aplicar el método bootstrap

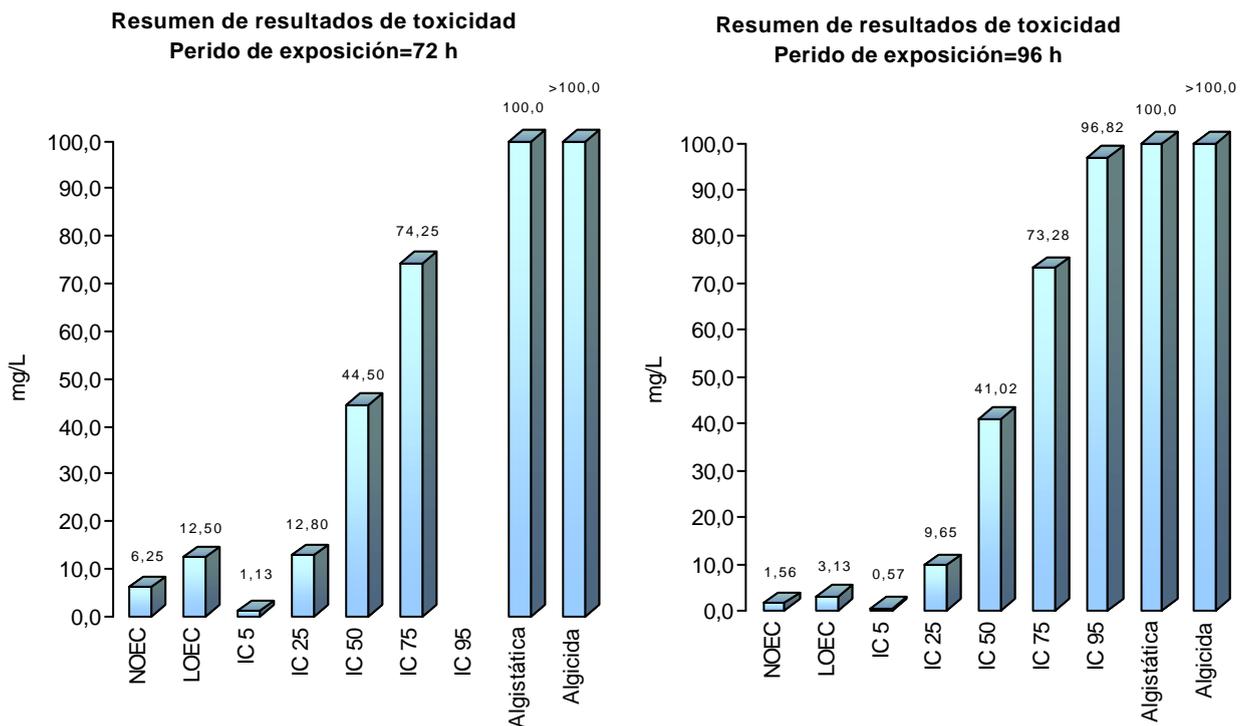
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de Zn (II) ensayadas con *I. galbana* (100, 50, 25 y 12,5) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo se observó aumento en la biomasa de todos los viales ensayados. Por lo tanto:

- Concentración alguistática= 100 mg/L
- Concentración alguicida= >100 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del zinc y *I. galbana*.



2.3. *Dunaliella salina*

Tabla A VIII.10.

Evolución de la biomasa de *Dunaliella salina*. Ensayo de ZINC (II).

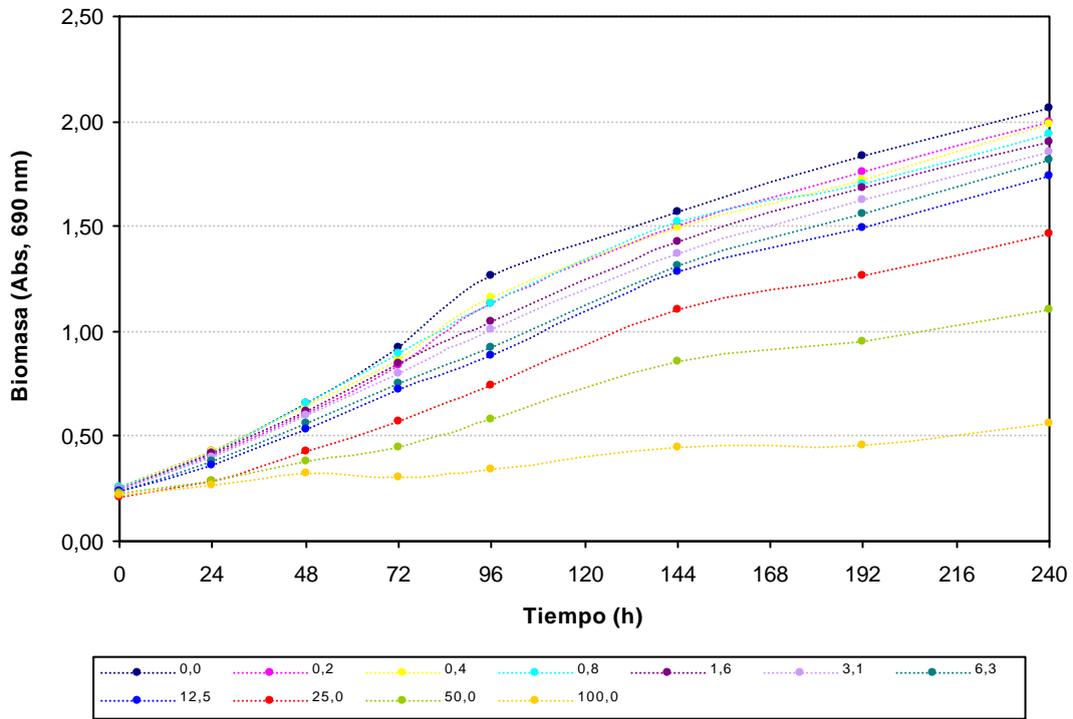
| | | <i>D. salina</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | Abs´ = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | |
|-------|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| t(d) | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| t(h) | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| 0,0 | | 0,258 | 0,436 | 0,723 | 0,991 | 1,330 | | | | 0,000 | 0,178 | 0,465 | 0,733 | 1,072 | | | |
| | | 0,261 | 0,438 | 0,685 | 0,957 | 1,265 | 1,573 | 1,833 | 2,062 | 0,000 | 0,177 | 0,424 | 0,696 | 1,004 | 1,312 | 1,572 | 1,801 |
| | | 0,252 | 0,398 | 0,556 | 0,810 | 1,193 | | | | 0,000 | 0,146 | 0,304 | 0,558 | 0,941 | | | |
| 0,2 | | 0,231 | 0,428 | 0,674 | 0,875 | 1,180 | | | | 0,000 | 0,197 | 0,443 | 0,644 | 0,949 | | | |
| | | 0,245 | 0,413 | 0,627 | 0,888 | 1,175 | 1,502 | 1,755 | 2,000 | 0,000 | 0,168 | 0,382 | 0,643 | 0,930 | 1,257 | 1,510 | 1,755 |
| | | 0,254 | 0,391 | 0,531 | 0,750 | 1,052 | | | | 0,000 | 0,137 | 0,277 | 0,496 | 0,798 | | | |
| 0,4 | | 0,259 | 0,459 | 0,752 | 0,992 | 1,200 | | | | 0,000 | 0,200 | 0,493 | 0,733 | 0,941 | | | |
| | | 0,244 | 0,423 | 0,650 | 0,873 | 1,195 | 1,490 | 1,720 | 1,988 | 0,000 | 0,179 | 0,406 | 0,629 | 0,951 | 1,246 | 1,476 | 1,744 |
| | | 0,255 | 0,389 | 0,537 | 0,740 | 1,075 | | | | 0,000 | 0,134 | 0,282 | 0,485 | 0,820 | | | |
| 0,8 | | 0,261 | 0,461 | 0,761 | 1,041 | 1,310 | | | | 0,000 | 0,200 | 0,500 | 0,780 | 1,049 | | | |
| | | 0,252 | 0,418 | 0,671 | 0,917 | 1,111 | 1,523 | 1,701 | 1,941 | 0,000 | 0,166 | 0,419 | 0,665 | 0,859 | 1,271 | 1,449 | 1,689 |
| | | 0,248 | 0,386 | 0,526 | 0,710 | 0,970 | | | | 0,000 | 0,138 | 0,278 | 0,462 | 0,722 | | | |
| 1,6 | | 0,238 | 0,440 | 0,675 | 0,927 | 1,146 | | | | 0,000 | 0,202 | 0,437 | 0,689 | 0,908 | | | |
| | | 0,240 | 0,410 | 0,638 | 0,879 | 1,085 | 1,423 | 1,687 | 1,904 | 0,000 | 0,170 | 0,398 | 0,639 | 0,845 | 1,183 | 1,447 | 1,664 |
| | | 0,258 | 0,391 | 0,528 | 0,738 | 0,898 | | | | 0,000 | 0,133 | 0,270 | 0,480 | 0,640 | | | |
| 3,1 | | 0,239 | 0,413 | 0,660 | 0,904 | 1,095 | | | | 0,000 | 0,174 | 0,421 | 0,665 | 0,856 | | | |
| | | 0,236 | 0,398 | 0,601 | 0,794 | 1,002 | 1,365 | 1,623 | 1,854 | 0,000 | 0,162 | 0,365 | 0,558 | 0,766 | 1,129 | 1,387 | 1,618 |
| | | 0,258 | 0,373 | 0,524 | 0,691 | 0,935 | | | | 0,000 | 0,115 | 0,266 | 0,433 | 0,677 | | | |
| 6,3 | | 0,231 | 0,395 | 0,589 | 0,767 | 0,950 | | | | 0,000 | 0,164 | 0,358 | 0,536 | 0,719 | | | |
| | | 0,247 | 0,389 | 0,569 | 0,776 | 0,961 | 1,312 | 1,559 | 1,820 | 0,000 | 0,142 | 0,322 | 0,529 | 0,714 | 1,065 | 1,312 | 1,573 |
| | | 0,238 | 0,358 | 0,525 | 0,703 | 0,848 | | | | 0,000 | 0,120 | 0,287 | 0,465 | 0,610 | | | |
| 12,5 | | 0,226 | 0,350 | 0,560 | 0,767 | 0,944 | | | | 0,000 | 0,124 | 0,334 | 0,541 | 0,718 | | | |
| | | 0,236 | 0,359 | 0,563 | 0,771 | 0,980 | 1,280 | 1,497 | 1,743 | 0,000 | 0,123 | 0,327 | 0,535 | 0,744 | 1,044 | 1,261 | 1,507 |
| | | 0,245 | 0,380 | 0,475 | 0,625 | 0,729 | | | | 0,000 | 0,135 | 0,230 | 0,380 | 0,484 | | | |
| 25,0 | | 0,219 | 0,319 | 0,444 | 0,609 | 0,813 | | | | 0,000 | 0,100 | 0,225 | 0,390 | 0,594 | | | |
| | | 0,211 | 0,275 | 0,417 | 0,559 | 0,688 | 1,099 | 1,261 | 1,466 | 0,000 | 0,064 | 0,206 | 0,348 | 0,477 | 0,888 | 1,050 | 1,255 |
| | | 0,210 | 0,274 | 0,416 | 0,544 | 0,710 | | | | 0,000 | 0,064 | 0,206 | 0,334 | 0,500 | | | |
| 50,0 | | 0,206 | 0,285 | 0,389 | 0,437 | 0,586 | | | | 0,000 | 0,079 | 0,183 | 0,231 | 0,380 | | | |
| | | 0,236 | 0,294 | 0,381 | 0,487 | 0,631 | 0,858 | 0,952 | 1,104 | 0,000 | 0,058 | 0,145 | 0,251 | 0,395 | 0,622 | 0,716 | 0,868 |
| | | 0,244 | 0,287 | 0,365 | 0,419 | 0,531 | | | | 0,000 | 0,043 | 0,121 | 0,175 | 0,287 | | | |
| 100,0 | | 0,232 | 0,293 | 0,345 | 0,303 | 0,399 | | | | 0,000 | 0,061 | 0,113 | 0,071 | 0,167 | | | |
| | | 0,227 | 0,263 | 0,347 | 0,305 | 0,303 | 0,445 | 0,459 | 0,557 | 0,000 | 0,036 | 0,120 | 0,078 | 0,076 | 0,218 | 0,232 | 0,330 |
| | | 0,198 | 0,253 | 0,281 | 0,302 | 0,320 | | | | 0,000 | 0,055 | 0,083 | 0,104 | 0,122 | | | |

Tabla A VIII.11.

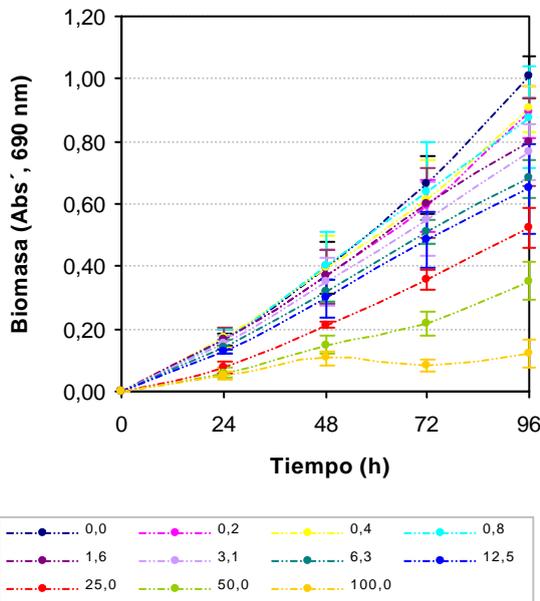
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs´)

| t (h) | mg/L ZINC (II) | | | | | | | | | | | Promedio |
|-------|----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----------|
| | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,1 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | |
| 24 | 0,167 | 0,167 | 0,171 | 0,168 | 0,168 | 0,150 | 0,142 | 0,127 | 0,076 | 0,060 | 0,051 | DesvEst |
| | 0,018 | 0,030 | 0,034 | 0,031 | 0,035 | 0,031 | 0,022 | 0,007 | 0,021 | 0,018 | 0,013 | |
| 48 | 0,398 | 0,367 | 0,394 | 0,399 | 0,368 | 0,351 | 0,322 | 0,297 | 0,212 | 0,150 | 0,105 | DesvEst |
| | 0,084 | 0,084 | 0,106 | 0,112 | 0,087 | 0,078 | 0,036 | 0,058 | 0,011 | 0,031 | 0,020 | |
| 72 | 0,662 | 0,594 | 0,616 | 0,636 | 0,603 | 0,552 | 0,510 | 0,485 | 0,357 | 0,219 | 0,084 | DesvEst |
| | 0,092 | 0,085 | 0,125 | 0,161 | 0,109 | 0,116 | 0,039 | 0,091 | 0,029 | 0,039 | 0,017 | |
| 96 | 1,006 | 0,892 | 0,904 | 0,877 | 0,798 | 0,766 | 0,681 | 0,649 | 0,524 | 0,354 | 0,122 | DesvEst |
| | 0,066 | 0,082 | 0,073 | 0,164 | 0,140 | 0,090 | 0,062 | 0,143 | 0,062 | 0,059 | 0,046 | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

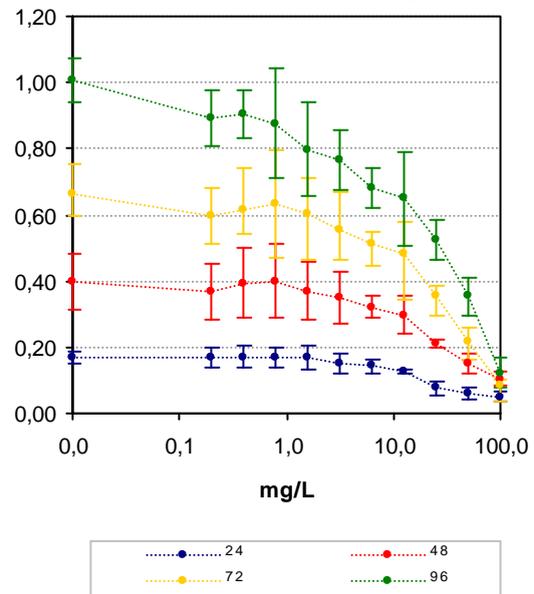


Tabla A VIII.12.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *D. salina* expuesta a diferentes concentraciones de ZINC (II).

| <i>D. salina</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,952 | | 0,937 | | 0,948 | | 0,961 | |
| B calculado | 5,92 | | 12,17 | | 11,69 | | 6,31 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L Zn (II) | t _i | p |
| 0,2 | -0,02 | 0,49383 | 0,51 | 0,34026 | 0,90 | 0,20062 | 1,42 | 0,06766 |
| 0,4 | -0,19 | 0,43265 | 0,07 | 0,48078 | 0,61 | 0,31476 | 1,28 | 0,07343 |
| 0,8 | -0,05 | 0,48196 | -0,02 | 0,49382 | 0,35 | 0,40784 | 1,62 | 0,13747 |
| 1,6 | -0,06 | 0,47783 | 0,50 | 0,34803 | 0,79 | 0,25477 | 2,61 | 0,04017 |
| 3,1 | 0,81 | 0,23436 | 0,79 | 0,25856 | 1,45 | 0,13349 | 3,01 (*) | 0,01008 |
| 6,3 | 1,22 | 0,10196 | 1,27 | 0,11222 | 2,01 | 0,02898 | 4,08 | 0,00166 |
| 12,5 | 1,93 | 0,01194 | 1,70 | 0,08108 | 2,33 | 0,03872 | 4,48 | 0,00858 |
| 25,0 | 4,43 (*) | 0,00233 | 3,13 (*) | 0,00952 | 4,02 (*) | 0,00273 | 6,05 | 0,00038 |
| 50,0 | 5,21 | 0,00097 | 4,19 | 0,00430 | 5,84 | 0,00078 | 8,18 | 0,00011 |
| 100,0 | 5,67 | 0,00042 | 4,94 | 0,00208 | 7,61 | 0,00022 | 11,10 | 0,00002 |
| MSD | 0,054 | | 0,156 | | 0,200 | | 0,210 | |
| % reducción | 32,46 | | 39,30 | | 30,27 | | 20,90 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|------|-------|------|-------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,912 | | 0,932 | | 0,922 | | 0,937 | | 0,942 | | 0,948 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 0,90 | | 2,99 | | 3,09 | | 5,87 | | 7,58 | | 11,69 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L Zn (II) | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,2 | 0,71 | 0,20 | 0,76 | 0,20 | 0,77 | 0,20 | 0,82 | 0,20 | 0,86 | 0,20 | 0,90 | 0,20 |
| 0,4 | 0,49 | 0,31 | 0,52 | 0,31 | 0,53 | 0,31 | 0,56 | 0,31 | 0,59 | 0,31 | 0,61 | 0,31 |
| 0,8 | 0,28 | 0,41 | 0,30 | 0,41 | 0,30 | 0,41 | 0,32 | 0,41 | 0,34 | 0,41 | 0,35 | 0,41 |
| 1,6 | 0,62 | 0,25 | 0,67 | 0,25 | 0,68 | 0,25 | 0,72 | 0,25 | 0,75 | 0,25 | 0,79 | 0,25 |
| 3,1 | 1,15 | 0,13 | 1,23 | 0,13 | 1,26 | 0,13 | 1,33 | 0,13 | 1,39 | 0,13 | 1,45 | 0,13 |
| 6,3 | --- | --- | 1,70 | 0,03 | 1,74 | 0,03 | 1,83 | 0,03 | 1,92 | 0,03 | 2,01 | 0,03 |
| 12,5 | --- | --- | --- | --- | 2,02 | 0,04 | 2,13 | 0,04 | 2,23 | 0,04 | 2,33 | 0,04 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 3,67(*) | 0,00 | 3,84(*) | 0,00 | 4,02(*) | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 5,58 | 0,00 | 5,84 | 0,00 |
| 100,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 7,61 | 0,00 |
| MSD | 0,239 | | 0,226 | | 0,225 | | 0,214 | | 0,207 | | 0,202 | |
| % reducción | 36,16 | | 34,19 | | 33,93 | | 32,38 | | 31,22 | | 30,27 | |

Tabla A VIII.13.
Valores de ICp del ensayo de *D. salina* y Zn (II) a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de Zn (II) estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,1371 | -0,0340 | 0,0556 | 0,7988 | 3,6112 | 7,4327 | 1,0427 |
| | 25 | 9,6073 | -7,2872 | 1,5623 | 8,6830 | 16,8725 | 24,8642 | 4,7301 |
| | 50 | 29,7289 | 15,4232 | 22,9167 | 29,2366 | 36,7834 | 44,5434 | 3,8240 |
| | 75 | 69,8329 | 39,0891 | 55,1930 | 68,4681 | 78,2546 | 87,5185 | 5,9521 |
| | 95 | (*) | | | | | | |
| 96 | 5 | 0,0912 | 0,0236 | 0,0590 | 0,1847 | 0,9361 | 1,8655 | 0,2296 |
| | 25 | 3,5675 | -2,3048 | 0,7712 | 3,3691 | 6,2221 | 9,1422 | 1,7880 |
| | 50 | 28,0697 | 11,4409 | 20,1512 | 27,8615 | 35,5714 | 43,8233 | 4,3876 |
| | 75 | 72,0768 | 50,5187 | 61,8110 | 71,6730 | 79,4922 | 87,6492 | 4,5026 |
| | 95 | (*) | | | | | | |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

(*) No es posible realizar la interpolación lineal del conjunto de datos para este porcentaje de respuesta

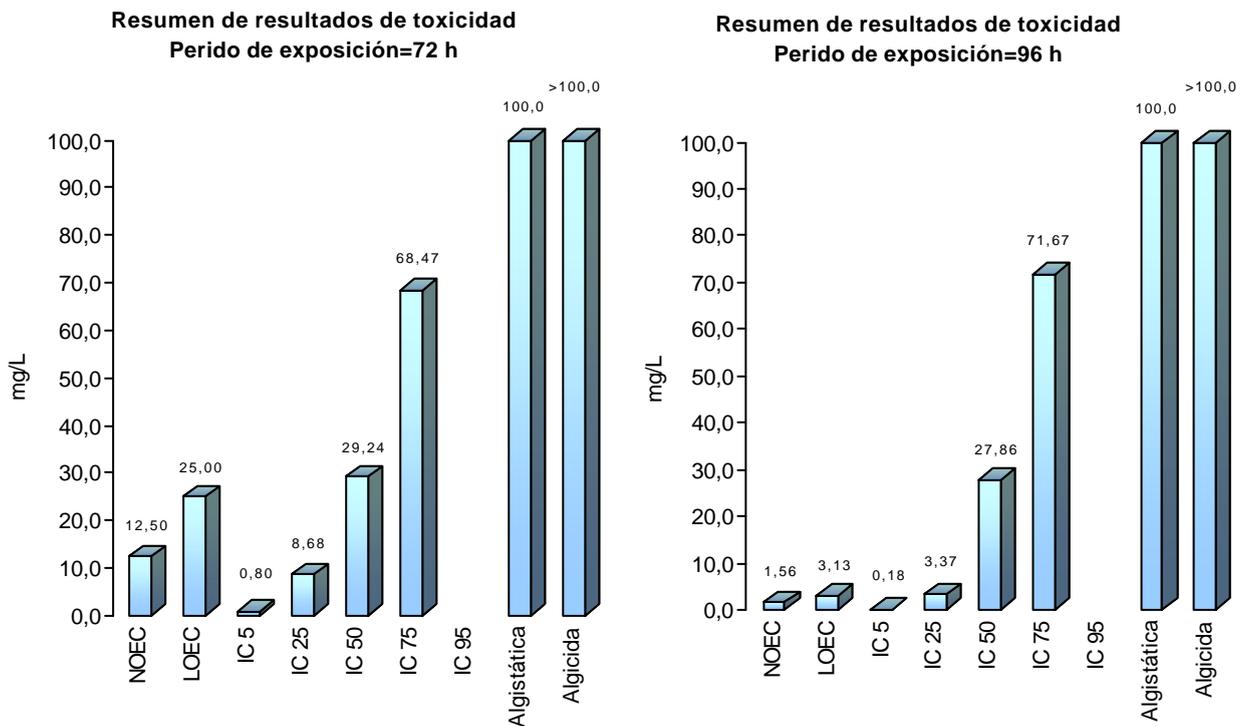
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUCIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de Zn (II) ensayadas con *D. salina* (100, 50, 25 y 12,5) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo se observó aumento en la biomasa de todos los viales ensayados. Por lo tanto:

- Concentración alguistática= 100 mg/L
- Concentración algucida= >100 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del zinc y *D. salina*.



2.4 *Chaetoceros gracilis*

Tabla A VIII.14.

Evolución de la biomasa de *Chaetoceros gracilis*. Ensayo de ZINC (II).

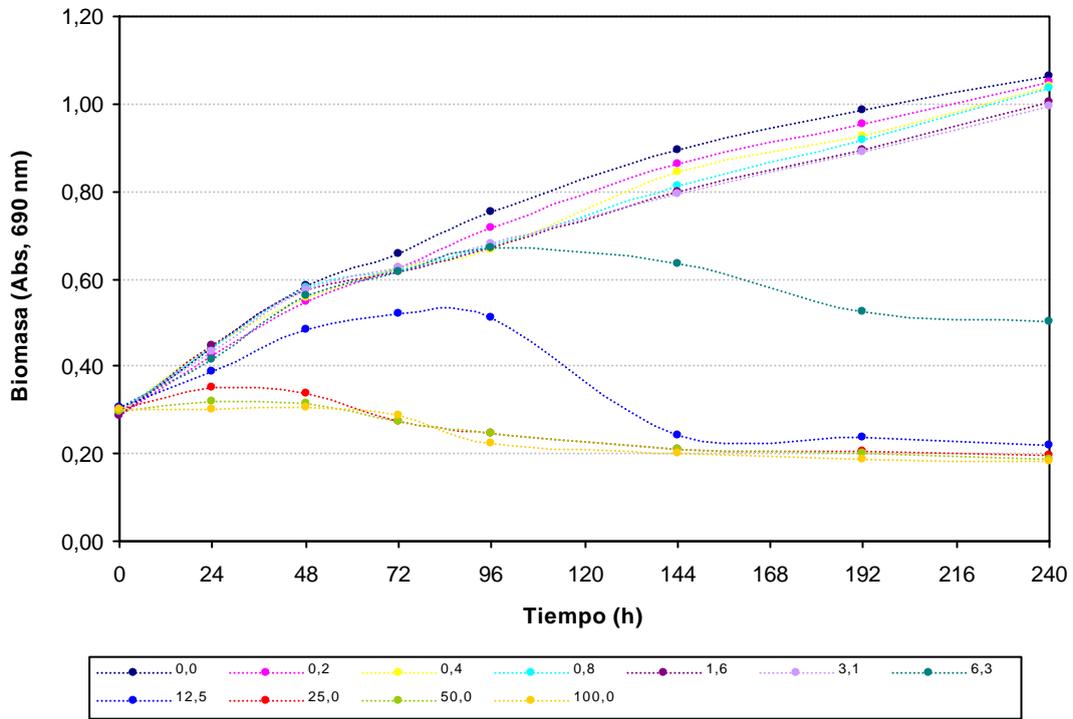
| t(d) | <i>C. gracilis</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | Abs´ = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | | | |
|--------------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | | |
| | t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| 0,0 | | 0,309 | 0,479 | 0,604 | 0,675 | 0,760 | | | | | 0,000 | 0,170 | 0,295 | 0,366 | 0,451 | | | | |
| | | 0,274 | 0,426 | 0,569 | 0,650 | 0,754 | 0,894 | 0,984 | 1,063 | | 0,000 | 0,152 | 0,295 | 0,376 | 0,480 | 0,620 | 0,710 | 0,789 | |
| | | 0,285 | 0,421 | 0,585 | 0,643 | 0,749 | | | | | 0,000 | 0,136 | 0,300 | 0,358 | 0,464 | | | | |
| 0,2 | | 0,291 | 0,422 | 0,560 | 0,641 | 0,725 | | | | | 0,000 | 0,131 | 0,269 | 0,350 | 0,434 | | | | |
| | | 0,267 | 0,389 | 0,534 | 0,634 | 0,719 | 0,864 | 0,954 | 1,051 | | 0,000 | 0,122 | 0,267 | 0,367 | 0,452 | 0,597 | 0,687 | 0,784 | |
| | | 0,307 | 0,457 | 0,555 | 0,595 | 0,700 | | | | | 0,000 | 0,150 | 0,248 | 0,288 | 0,393 | | | | |
| 0,4 | | 0,299 | 0,451 | 0,551 | 0,641 | 0,674 | | | | | 0,000 | 0,152 | 0,252 | 0,342 | 0,375 | | | | |
| | | 0,301 | 0,429 | 0,560 | 0,634 | 0,686 | 0,844 | 0,927 | 1,042 | | 0,000 | 0,128 | 0,259 | 0,333 | 0,385 | 0,543 | 0,626 | 0,741 | |
| | | 0,280 | 0,463 | 0,555 | 0,595 | 0,636 | | | | | 0,000 | 0,183 | 0,275 | 0,315 | 0,356 | | | | |
| 0,8 | | 0,296 | 0,457 | 0,604 | 0,613 | 0,674 | | | | | 0,000 | 0,161 | 0,308 | 0,317 | 0,378 | | | | |
| | | 0,300 | 0,422 | 0,576 | 0,644 | 0,706 | 0,814 | 0,916 | 1,035 | | 0,000 | 0,122 | 0,276 | 0,344 | 0,406 | 0,514 | 0,616 | 0,735 | |
| | | 0,293 | 0,451 | 0,560 | 0,601 | 0,650 | | | | | 0,000 | 0,158 | 0,267 | 0,308 | 0,357 | | | | |
| 1,6 | | 0,283 | 0,449 | 0,600 | 0,637 | 0,683 | | | | | 0,000 | 0,166 | 0,317 | 0,354 | 0,400 | | | | |
| | | 0,285 | 0,427 | 0,581 | 0,641 | 0,682 | 0,799 | 0,895 | 1,002 | | 0,000 | 0,142 | 0,296 | 0,356 | 0,397 | 0,514 | 0,610 | 0,717 | |
| | | 0,290 | 0,471 | 0,540 | 0,569 | 0,650 | | | | | 0,000 | 0,181 | 0,250 | 0,279 | 0,360 | | | | |
| 3,1 | | 0,301 | 0,438 | 0,604 | 0,673 | 0,712 | | | | | 0,000 | 0,137 | 0,303 | 0,372 | 0,411 | | | | |
| | | 0,302 | 0,414 | 0,575 | 0,613 | 0,679 | 0,794 | 0,892 | 0,994 | | 0,000 | 0,112 | 0,273 | 0,311 | 0,377 | 0,492 | 0,590 | 0,692 | |
| | | 0,285 | 0,453 | 0,551 | 0,590 | 0,643 | | | | | 0,000 | 0,168 | 0,266 | 0,305 | 0,358 | | | | |
| 6,3 | | 0,305 | 0,430 | 0,579 | 0,638 | 0,703 | | | | | 0,000 | 0,125 | 0,274 | 0,333 | 0,398 | | | | |
| | | 0,311 | 0,414 | 0,562 | 0,619 | 0,663 | 0,633 | 0,524 | 0,502 | | 0,000 | 0,103 | 0,251 | 0,308 | 0,352 | 0,322 | 0,213 | 0,191 | |
| | | 0,304 | 0,398 | 0,546 | 0,592 | 0,644 | | | | | 0,000 | 0,094 | 0,242 | 0,288 | 0,340 | | | | |
| 12,5 | | 0,292 | 0,411 | 0,477 | 0,524 | 0,537 | | | | | 0,000 | 0,119 | 0,185 | 0,232 | 0,245 | | | | |
| | | 0,320 | 0,391 | 0,499 | 0,518 | 0,503 | 0,244 | 0,237 | 0,221 | | 0,000 | 0,071 | 0,179 | 0,198 | 0,183 | -0,076 | -0,083 | -0,099 | |
| | | 0,310 | 0,365 | 0,469 | 0,516 | 0,487 | | | | | 0,000 | 0,055 | 0,159 | 0,206 | 0,177 | | | | |
| 25,0 | | 0,294 | 0,377 | 0,327 | 0,260 | 0,238 | | | | | 0,000 | 0,083 | 0,033 | -0,034 | -0,056 | | | | |
| | | 0,317 | 0,346 | 0,352 | 0,298 | 0,269 | 0,210 | 0,206 | 0,197 | | 0,000 | 0,029 | 0,035 | -0,019 | -0,048 | -0,107 | -0,111 | -0,120 | |
| | | 0,289 | 0,326 | 0,338 | 0,268 | 0,237 | | | | | 0,000 | 0,037 | 0,049 | -0,021 | -0,052 | | | | |
| 50,0 | | 0,292 | 0,325 | 0,315 | 0,261 | 0,239 | | | | | 0,000 | 0,033 | 0,023 | -0,031 | -0,053 | | | | |
| | | 0,296 | 0,338 | 0,307 | 0,273 | 0,241 | 0,210 | 0,199 | 0,187 | | 0,000 | 0,042 | 0,011 | -0,023 | -0,055 | -0,086 | -0,097 | -0,109 | |
| | | 0,298 | 0,300 | 0,328 | 0,286 | 0,254 | | | | | 0,000 | 0,002 | 0,030 | -0,012 | -0,044 | | | | |
| 100,0 | | 0,300 | 0,304 | 0,286 | 0,270 | 0,228 | | | | | 0,000 | 0,004 | -0,014 | -0,030 | -0,072 | | | | |
| | | 0,304 | 0,319 | 0,309 | 0,280 | 0,230 | 0,201 | 0,189 | 0,184 | | 0,000 | 0,015 | 0,005 | -0,024 | -0,074 | -0,103 | -0,115 | -0,120 | |
| | | 0,299 | 0,283 | 0,316 | 0,309 | 0,217 | | | | | 0,000 | -0,016 | 0,017 | 0,010 | -0,082 | | | | |

Tabla A VIII.15.

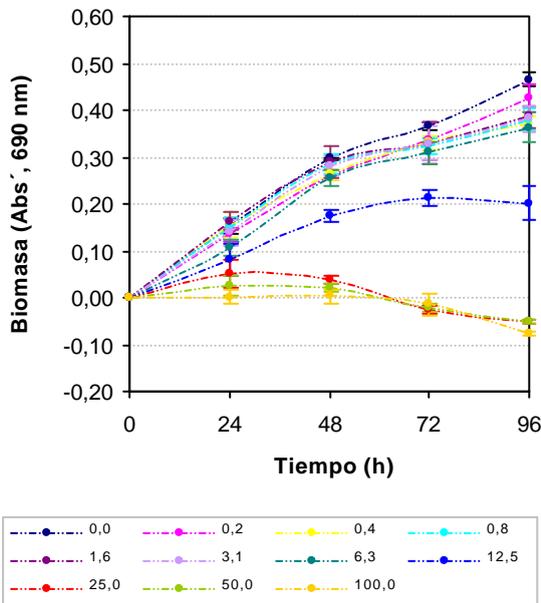
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs´)

| t (h) | mg/L ZINC (II) | | | | | | | | | | | Promedio |
|-----------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|----------|
| | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,1 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | |
| 24 | 0,153 | 0,134 | 0,154 | 0,147 | 0,163 | 0,139 | 0,107 | 0,082 | 0,050 | 0,026 | 0,001 | |
| | 0,017 | 0,014 | 0,028 | 0,022 | 0,020 | 0,028 | 0,016 | 0,033 | 0,029 | 0,021 | 0,016 | DesvEst |
| 48 | 0,297 | 0,261 | 0,262 | 0,284 | 0,288 | 0,281 | 0,256 | 0,174 | 0,039 | 0,021 | 0,003 | |
| | 0,003 | 0,012 | 0,012 | 0,022 | 0,034 | 0,020 | 0,017 | 0,014 | 0,009 | 0,010 | 0,016 | DesvEst |
| 72 | 0,367 | 0,335 | 0,330 | 0,323 | 0,330 | 0,329 | 0,310 | 0,212 | -0,025 | -0,022 | -0,015 | |
| | 0,009 | 0,042 | 0,014 | 0,019 | 0,044 | 0,037 | 0,023 | 0,018 | 0,008 | 0,010 | 0,022 | DesvEst |
| 96 | 0,465 | 0,426 | 0,372 | 0,380 | 0,386 | 0,382 | 0,363 | 0,202 | -0,052 | -0,051 | -0,076 | |
| | 0,015 | 0,030 | 0,015 | 0,025 | 0,022 | 0,027 | 0,031 | 0,038 | 0,004 | 0,006 | 0,005 | DesvEst |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

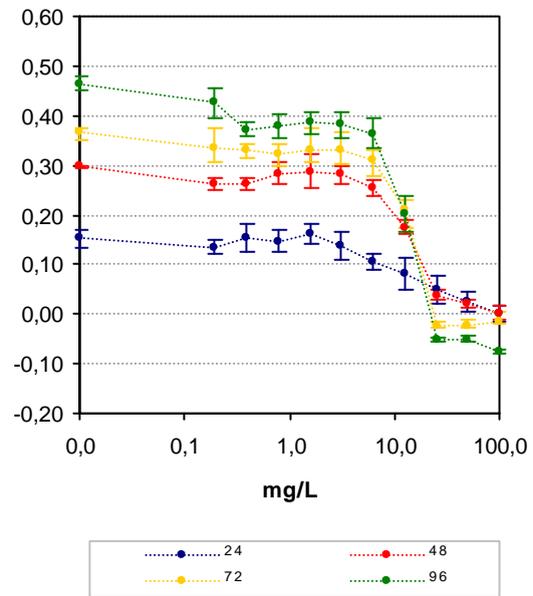


Tabla A VIII.16.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *C. gracilis* expuesta a diferentes concentraciones de ZINC (II).

| <i>C. gracilis</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|--|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,942 | | 0,982 | | 0,973 | | 0,971 | |
| B calculado | 2,79 | | 10,19 | | 11,15 | | 13,66 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L Zn (II) | t _i | p |
| 0,2 | 0,98 | 0,11308 | 2,55 | 0,00343 | 1,53 | 0,13343 | 2,10 | 0,05829 |
| 0,4 | -0,09 | 0,46664 | 2,50 | 0,00389 | 1,77 | 0,00905 | 5,05 (*) | 0,00073 |
| 0,8 | 0,30 | 0,36993 | 0,94 | 0,17943 | 2,11 | 0,01101 | 4,60 | 0,00341 |
| 1,6 | -0,55 | 0,26458 | 0,65 | 0,33692 | 1,78 | 0,11294 | 4,31 | 0,00333 |
| 3,1 | 0,73 | 0,25526 | 1,15 | 0,11775 | 1,80 | 0,08268 | 4,51 | 0,00462 |
| 6,3 | 2,42 | 0,01405 | 2,95 (*) | 0,00664 | 2,75 (*) | 0,00764 | 5,52 | 0,00327 |
| 12,5 | 3,79 (*) | 0,01513 | 8,82 | 0,00005 | 7,46 | 0,00009 | 14,30 | 0,00017 |
| 25,0 | 5,49 | 0,00307 | 18,57 | 0,00000 | 18,87 | 0,00000 | 28,07 | 0,00000 |
| 50,0 | 6,77 | 0,00062 | 19,84 | 0,00000 | 18,74 | 0,00000 | 28,00 | 0,00000 |
| 100,0 | 8,09 | 0,00017 | 21,19 | 0,00000 | 18,39 | 0,00000 | 29,37 | 0,00000 |
| MSD | 0,049 | | 0,037 | | 0,055 | | 0,049 | |
| % reducción | 32,42 | | 12,35 | | 14,93 | | 10,46 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)=2,64 * La media para esta concentración es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|------|-------|------|---------|------|---------|------|---------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,971 | | 0,972 | | 0,971 | | 0,976 | | 0,976 | | 0,973 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 5,61 | | 5,85 | | 6,46 | | 9,09 | | 11,06 | | 11,15 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L Zn (II) | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,2 | 1,26 | 0,13 | 1,31 | 0,13 | 1,36 | 0,13 | 1,44 | 0,13 | 1,51 | 0,13 | 1,53 | 0,13 |
| 0,4 | 1,46 | 0,01 | 1,51 | 0,01 | 1,58 | 0,01 | 1,67 | 0,01 | 1,74 | 0,01 | 1,77 | 0,01 |
| 0,8 | 1,74 | 0,01 | 1,80 | 0,01 | 1,88 | 0,01 | 1,98 | 0,01 | 2,08 | 0,01 | 2,11 | 0,01 |
| 1,6 | 1,48 | 0,11 | 1,53 | 0,11 | 1,59 | 0,11 | 1,68 | 0,11 | 1,76 | 0,11 | 1,78 | 0,11 |
| 3,1 | 1,49 | 0,08 | 1,54 | 0,08 | 1,61 | 0,08 | 1,70 | 0,08 | 1,78 | 0,08 | 1,80 | 0,08 |
| 6,3 | --- | --- | 2,35 | 0,01 | 2,45 | 0,01 | 2,59(*) | 0,01 | 2,71(*) | 0,01 | 2,75(*) | 0,01 |
| 12,5 | --- | --- | --- | --- | 6,66(*) | 0,00 | 7,03 | 0,00 | 7,36 | 0,00 | 7,46 | 0,00 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 17,78 | 0,00 | 18,61 | 0,00 | 18,87 | 0,00 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 18,48 | 0,00 | 18,74 | 0,00 |
| 100,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 18,39 | 0,00 |
| MSD | 0,063 | | 0,061 | | 0,059 | | 0,057 | | 0,055 | | 0,055 | |
| % reducción | 17,08 | | 16,71 | | 16,22 | | 15,49 | | 14,91 | | 14,93 | |

Tabla A VIII.17.
Valores de ICp del ensayo de *C. gracilis* y Zn (II) a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de Zn (II) estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 0,1129 | 0,3010 | 0,0735 | 0,1717 | 0,3382 | 0,5860 | 0,1852 |
| | 25 | 8,4684 | 6,2084 | 7,3922 | 8,4021 | 9,3442 | 10,3075 | 0,4946 |
| | 50 | 14,1903 | 12,5157 | 13,3929 | 14,1638 | 15,0323 | 15,9586 | 0,4456 |
| | 75 | 19,5951 | 18,7579 | 19,1964 | 19,5848 | 20,0162 | 20,4793 | 0,2246 |
| | 95 | 23,9190 | 23,7585 | 23,8426 | 23,9198 | 24,0050 | 24,0996 | 24,0996 |
| 96 | 5 | 0,1173 | 0,0033 | 0,0630 | 0,1317 | 0,2357 | 0,3660 | 0,0505 |
| | 25 | 6,8138 | 3,4322 | 5,2035 | 6,6841 | 7,6642 | 8,5996 | 0,6500 |
| | 50 | 11,3080 | 9,4492 | 10,4228 | 11,3556 | 13,0017 | 14,8648 | 0,6276 |
| | 75 | 17,7944 | 15,5239 | 16,7132 | 17,7330 | 19,0009 | 20,3279 | 0,6520 |
| | 95 | 23,5589 | 23,1048 | 23,3426 | 23,5554 | 23,8027 | 24,0709 | 0,1249 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

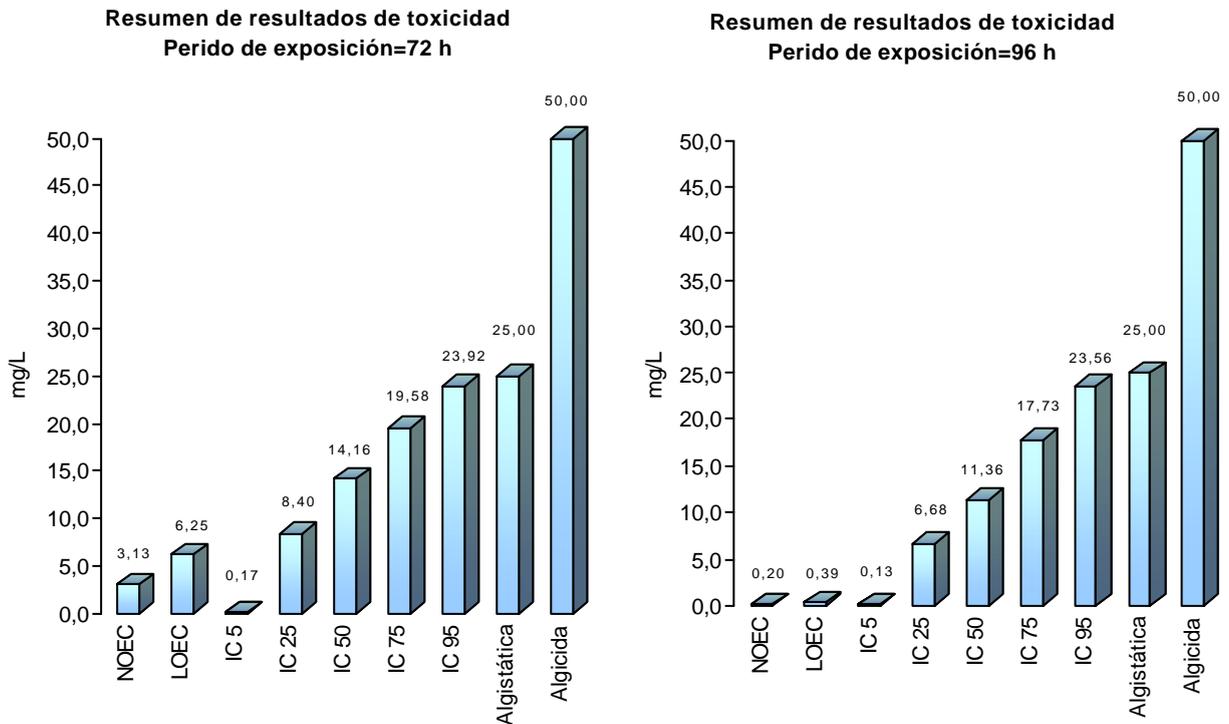
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de Zn (II) ensayadas con *C. gracilis* (100, 50, 25 y 12,5) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo se observó un aumento en la biomasa del vial correspondiente al estudio de 12,5 y 25 mg/L. Por lo tanto:

- Concentración alguistática= 25 mg/L
- Concentración alguicida= 50 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del zinc y *C. gracilis*.



2.5. *Tetraselmis chuii*

Tabla A VIII.18.

Evolución de la biomasa de *Tetraselmis chuii*. Ensayo de ZINC (II).

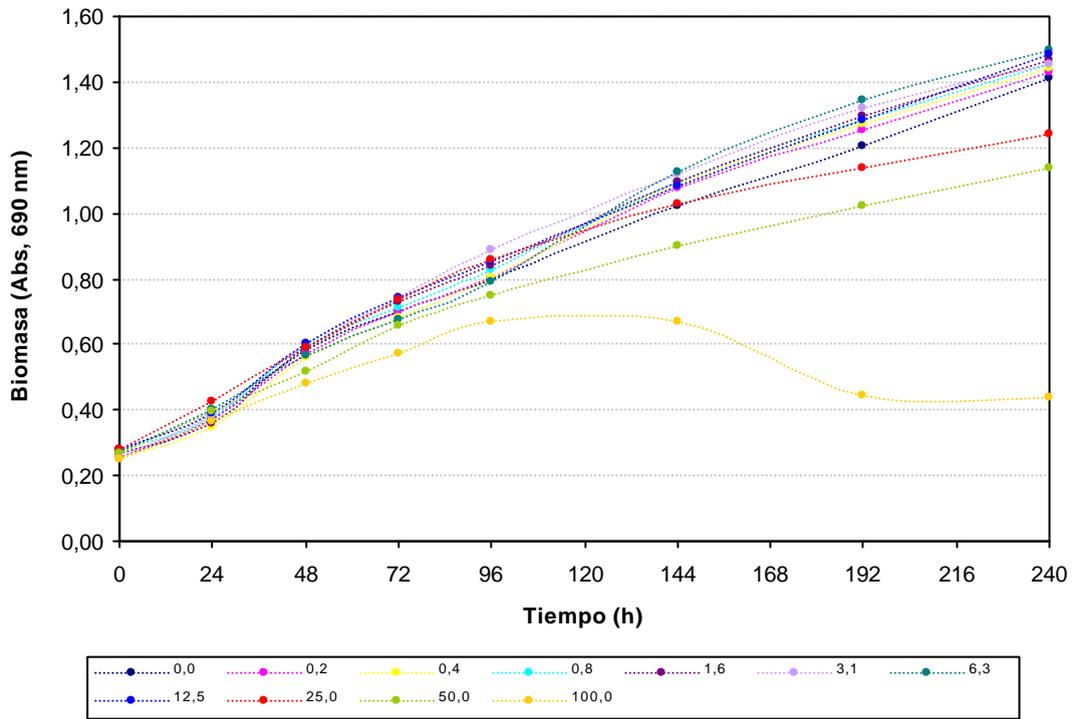
| <i>T. chuii</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| 0,0 | 0,261 | 0,418 | 0,595 | 0,714 | 0,811 | | | | 0,000 | 0,157 | 0,334 | 0,453 | 0,550 | | | | |
| | 0,250 | 0,363 | 0,580 | 0,706 | 0,798 | 1,023 | 1,205 | 1,410 | 0,000 | 0,113 | 0,330 | 0,456 | 0,548 | 0,773 | 0,955 | 1,160 | |
| | 0,256 | 0,331 | 0,573 | 0,672 | 0,790 | | | | 0,000 | 0,075 | 0,317 | 0,416 | 0,534 | | | | |
| 0,2 | 0,244 | 0,389 | 0,542 | 0,662 | 0,767 | | | | 0,000 | 0,145 | 0,298 | 0,418 | 0,523 | | | | |
| | 0,258 | 0,378 | 0,573 | 0,704 | 0,787 | 1,076 | 1,253 | 1,432 | 0,000 | 0,120 | 0,315 | 0,446 | 0,529 | 0,818 | 0,995 | 1,174 | |
| | 0,264 | 0,348 | 0,602 | 0,735 | 0,851 | | | | 0,000 | 0,084 | 0,338 | 0,471 | 0,587 | | | | |
| 0,4 | 0,248 | 0,398 | 0,576 | 0,704 | 0,819 | | | | 0,000 | 0,150 | 0,328 | 0,456 | 0,571 | | | | |
| | 0,256 | 0,335 | 0,586 | 0,712 | 0,840 | 1,086 | 1,273 | 1,444 | 0,000 | 0,079 | 0,330 | 0,456 | 0,584 | 0,830 | 1,017 | 1,188 | |
| | 0,261 | 0,316 | 0,526 | 0,634 | 0,754 | | | | 0,000 | 0,055 | 0,265 | 0,373 | 0,493 | | | | |
| 0,8 | 0,279 | 0,394 | 0,623 | 0,763 | 0,872 | | | | 0,000 | 0,115 | 0,344 | 0,484 | 0,593 | | | | |
| | 0,283 | 0,390 | 0,621 | 0,754 | 0,869 | 1,093 | 1,284 | 1,453 | 0,000 | 0,107 | 0,338 | 0,471 | 0,586 | 0,810 | 1,001 | 1,170 | |
| | 0,253 | 0,354 | 0,551 | 0,623 | 0,737 | | | | 0,000 | 0,101 | 0,298 | 0,370 | 0,484 | | | | |
| 1,6 | 0,267 | 0,425 | 0,643 | 0,772 | 0,881 | | | | 0,000 | 0,158 | 0,376 | 0,505 | 0,614 | | | | |
| | 0,267 | 0,353 | 0,606 | 0,754 | 0,877 | 1,095 | 1,293 | 1,469 | 0,000 | 0,086 | 0,339 | 0,487 | 0,610 | 0,828 | 1,026 | 1,202 | |
| | 0,266 | 0,303 | 0,525 | 0,660 | 0,760 | | | | 0,000 | 0,037 | 0,259 | 0,394 | 0,494 | | | | |
| 3,1 | 0,278 | 0,458 | 0,654 | 0,793 | 0,940 | | | | 0,000 | 0,180 | 0,376 | 0,515 | 0,662 | | | | |
| | 0,248 | 0,370 | 0,582 | 0,715 | 0,870 | 1,120 | 1,320 | 1,454 | 0,000 | 0,122 | 0,334 | 0,467 | 0,622 | 0,872 | 1,072 | 1,206 | |
| | 0,249 | 0,314 | 0,563 | 0,716 | 0,859 | | | | 0,000 | 0,065 | 0,314 | 0,467 | 0,610 | | | | |
| 6,3 | 0,271 | 0,441 | 0,566 | 0,662 | 0,766 | | | | 0,000 | 0,170 | 0,295 | 0,391 | 0,495 | | | | |
| | 0,293 | 0,394 | 0,624 | 0,766 | 0,911 | 1,127 | 1,346 | 1,498 | 0,000 | 0,101 | 0,331 | 0,473 | 0,618 | 0,834 | 1,053 | 1,205 | |
| | 0,257 | 0,370 | 0,505 | 0,604 | 0,687 | | | | 0,000 | 0,113 | 0,248 | 0,347 | 0,430 | | | | |
| 12,5 | 0,302 | 0,405 | 0,601 | 0,756 | 0,874 | | | | 0,000 | 0,103 | 0,299 | 0,454 | 0,572 | | | | |
| | 0,269 | 0,408 | 0,653 | 0,800 | 0,906 | 1,085 | 1,283 | 1,486 | 0,000 | 0,139 | 0,384 | 0,531 | 0,637 | 0,816 | 1,014 | 1,217 | |
| | 0,276 | 0,351 | 0,558 | 0,666 | 0,783 | | | | 0,000 | 0,075 | 0,282 | 0,390 | 0,507 | | | | |
| 25,0 | 0,286 | 0,436 | 0,595 | 0,729 | 0,839 | | | | 0,000 | 0,150 | 0,309 | 0,443 | 0,553 | | | | |
| | 0,276 | 0,446 | 0,600 | 0,744 | 0,852 | 1,031 | 1,136 | 1,243 | 0,000 | 0,170 | 0,324 | 0,468 | 0,576 | 0,755 | 0,860 | 0,967 | |
| | 0,284 | 0,393 | 0,584 | 0,730 | 0,881 | | | | 0,000 | 0,109 | 0,300 | 0,446 | 0,597 | | | | |
| 50,0 | 0,267 | 0,438 | 0,542 | 0,694 | 0,781 | | | | 0,000 | 0,171 | 0,275 | 0,427 | 0,514 | | | | |
| | 0,255 | 0,379 | 0,510 | 0,653 | 0,750 | 0,899 | 1,023 | 1,137 | 0,000 | 0,124 | 0,255 | 0,398 | 0,495 | 0,644 | 0,768 | 0,882 | |
| | 0,279 | 0,366 | 0,506 | 0,625 | 0,718 | | | | 0,000 | 0,087 | 0,227 | 0,346 | 0,439 | | | | |
| 100,0 | 0,238 | 0,422 | 0,527 | 0,648 | 0,773 | | | | 0,000 | 0,184 | 0,289 | 0,410 | 0,535 | | | | |
| | 0,246 | 0,351 | 0,477 | 0,548 | 0,635 | 0,668 | 0,443 | 0,437 | 0,000 | 0,105 | 0,231 | 0,302 | 0,389 | 0,422 | 0,197 | 0,191 | |
| | 0,259 | 0,323 | 0,442 | 0,526 | 0,606 | | | | 0,000 | 0,064 | 0,183 | 0,267 | 0,347 | | | | |

Tabla A VIII.19.

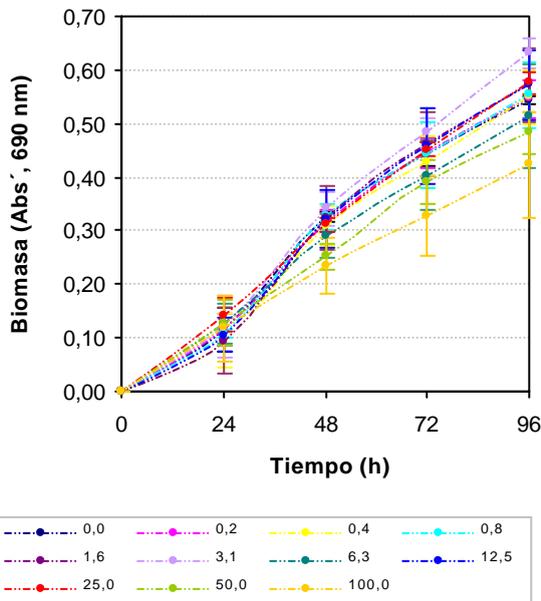
Valores promedio de la concentración de biomasa normalizada (Abs')

| t (h) | mg/L ZINC (II) | | | | | | | | | | | Promedio |
|-----------|----------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|----------|
| | 0,0 | 0,2 | 0,4 | 0,8 | 1,6 | 3,1 | 6,3 | 12,5 | 25,0 | 50,0 | 100,0 | |
| 24 | 0,115 | 0,116 | 0,095 | 0,108 | 0,094 | 0,122 | 0,128 | 0,106 | 0,143 | 0,127 | 0,118 | DesvEst |
| | 0,041 | 0,031 | 0,049 | 0,007 | 0,061 | 0,058 | 0,037 | 0,032 | 0,031 | 0,042 | 0,061 | |
| 48 | 0,327 | 0,317 | 0,308 | 0,327 | 0,325 | 0,341 | 0,291 | 0,322 | 0,311 | 0,252 | 0,234 | DesvEst |
| | 0,009 | 0,020 | 0,037 | 0,025 | 0,060 | 0,032 | 0,042 | 0,055 | 0,012 | 0,024 | 0,053 | |
| 72 | 0,442 | 0,445 | 0,428 | 0,442 | 0,462 | 0,483 | 0,404 | 0,458 | 0,452 | 0,390 | 0,326 | DesvEst |
| | 0,022 | 0,027 | 0,048 | 0,062 | 0,060 | 0,028 | 0,064 | 0,071 | 0,014 | 0,041 | 0,075 | |
| 96 | 0,544 | 0,546 | 0,549 | 0,554 | 0,573 | 0,631 | 0,514 | 0,572 | 0,575 | 0,483 | 0,424 | DesvEst |
| | 0,009 | 0,035 | 0,049 | 0,061 | 0,068 | 0,027 | 0,095 | 0,065 | 0,022 | 0,039 | 0,099 | |

Evolución de la biomasa a lo largo del periodo de ensayo



Variación temporal de la biomasa



Variación de la biomasa entre concentraciones de ensayo

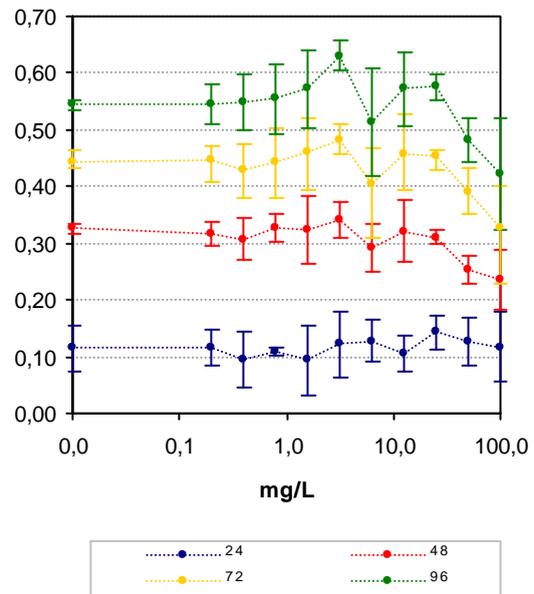


Tabla A VIII.20.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *T. chuii* expuesta a diferentes concentraciones de ZINC (II).

| <i>C. gracilis</i> | 24 horas | | 48 horas | | 72 horas | | 96 horas | |
|---|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|----------------|---------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | |
| W calculado | 0,947 | | 0,985 | | 0,963 | | 0,964 | |
| B calculado | 6,87 | | 9,73 | | 7,86 | | 11,71 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | |
| mg/L Zn (II) | t _i | p |
| 0,2 | -0,04 | 0,48310 | 0,33 | 0,23714 | -0,08 | 0,43784 | -0,05 | 0,45848 |
| 0,4 | 0,57 | 0,30630 | 0,63 | 0,21408 | 0,32 | 0,34233 | -0,11 | 0,43118 |
| 0,8 | 0,21 | 0,38776 | 0,01 | 0,49184 | 0,00 | 0,50000 | -0,22 | 0,39297 |
| 1,6 | 0,60 | 0,32058 | 0,08 | 0,47496 | -0,49 | 0,30463 | -0,60 | 0,25495 |
| 3,1 | -0,21 | 0,43302 | -0,47 | 0,24605 | -1,00 | 0,05718 | -1,82 | 0,00306 |
| 6,3 | -0,36 | 0,35202 | 1,17 | 0,11013 | 0,92 | 0,19306 | 0,62 | 0,31021 |
| 12,5 | 0,26 | 0,38590 | 0,18 | 0,43779 | -0,40 | 0,35823 | -0,58 | 0,25033 |
| 25,0 | -0,79 | 0,19978 | 0,53 | 0,06952 | -0,26 | 0,25926 | -0,65 | 0,04180 |
| 50,0 | -0,35 | 0,36736 | 2,45 | 0,00366 | 1,24 | 0,06482 | 1,28 | 0,02823 |
| 100,0 | -0,07 | 0,47646 | 3,04 (*) | 0,02032 | 2,79 (*) | 0,03107 | 2,51 | 0,05160 |
| MSD | 0,094 | | 0,080 | | 0,109 | | 0,127 | |
| % reducción | 81,84 | | 24,60 | | 24,71 | | 23,27 | |
| <i>W crítica</i> (N=33 y $\alpha=0,05$)= 0,931; <i>B crítica</i> (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=18,31; <i>T crítica</i> (22 grados de libertad y 10 concentraciones)= 2,64 * La media para esta concentración es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola). | | | | | | | | |

| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|-------|------|---------|------|
| t=72 h | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| W crítica | 0,897 | | 0,908 | | 0,916 | | 0,923 | | 0,927 | | 0,931 | |
| W calculado | 0,887 | | 0,943 | | 0,946 | | 0,954 | | 0,957 | | 0,963 | |
| B crítica | 11,07 | | 12,59 | | 14,07 | | 15,51 | | 16,92 | | 18,31 | |
| B calculado | 3,14 | | 3,61 | | 4,18 | | 7,00 | | 7,07 | | 7,86 | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | | | |
| mg/L Zn (II) | n=18 | | n=21 | | n=24 | | n=27 | | n=30 | | n=33 | |
| T crítica | 2,50 | | 2,53 | | 2,56 | | 2,58 | | 2,60 | | 2,64 | |
| 0,2 | -0,09 | 0,44 | -0,09 | 0,44 | -0,08 | 0,44 | -0,08 | 0,44 | -0,09 | 0,44 | -0,08 | 0,44 |
| 0,4 | 0,37 | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,32 | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,34 | 0,32 | 0,34 |
| 0,8 | 0,00 | 0,50 | 0,00 | 0,50 | 0,00 | 0,50 | 0,00 | 0,50 | 0,00 | 0,50 | 0,00 | 0,50 |
| 1,6 | -0,56 | 0,30 | -0,52 | 0,30 | -0,49 | 0,30 | -0,52 | 0,30 | -0,52 | 0,30 | -0,49 | 0,30 |
| 3,1 | -1,15 | 0,06 | -1,07 | 0,06 | -0,99 | 0,06 | -1,05 | 0,06 | -1,06 | 0,06 | -1,00 | 0,06 |
| 6,3 | --- | --- | 0,98 | 0,19 | 0,91 | 0,19 | 0,96 | 0,19 | 0,98 | 0,19 | 0,92 | 0,19 |
| 12,5 | --- | --- | --- | --- | -0,40 | 0,36 | -0,42 | 0,36 | -0,43 | 0,36 | -0,40 | 0,36 |
| 25,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | -0,27 | 0,26 | -0,27 | 0,26 | -0,26 | 0,26 |
| 50,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 1,32 | 0,06 | 1,24 | 0,06 |
| 100,0 | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | 2,79(*) | 0,03 |
| MSD | 0,090 | | 0,098 | | 0,107 | | 0,102 | | 0,101 | | 0,109 | |
| % reducción | 20,41 | | 22,22 | | 24,12 | | 23,02 | | 22,88 | | 24,71 | |

Tabla A VIII.21.
Valores de ICp del ensayo de *T. chuii* y Zn (II) a las 72 y 96 horas de ensayo.

| t (h) | % inh. | Concentración de Zn (II) estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | |
|-------|--------|---|---------------------------|---------------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| | | Int. Lineal | Lim. Conf. Expandido Inf. | Lim. Conf. Original. Inf. | Valor medio | Lim. Conf. Original. Sup. | Lim. Conf. Expandido Sup. | Desv.Est. |
| 72 | 5 | 30,4142 | -24,2457 | 4,3857 | 22,6217 | 44,4242 | 59,8351 | 13,3444 |
| | 25 | 91,1133 | (**) | (**) | 81,4061 | (**) | (**) | 10,3134 |
| | 50 | (*) | | | | | | |
| | 75 | (*) | | | | | | |
| | 95 | (*) | | | | | | |
| 96 | 5 | 30,5714 | -23,6083 | 4,7715 | 25,2699 | 38,4402 | 47,0959 | 11,5475 |
| | 25 | 99,0819 | (***) | | | | | |
| | 50 | (*) | | | | | | |
| | 75 | (*) | | | | | | |
| | 95 | (*) | | | | | | |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; Desv.Est.: Desviación estándar

(*) No es posible realizar la interpolación lineal del conjunto de datos para este porcentaje de respuesta

(**) No es posible calcular los límites de confianza

(***) No es posible aplicar el método bootstrap

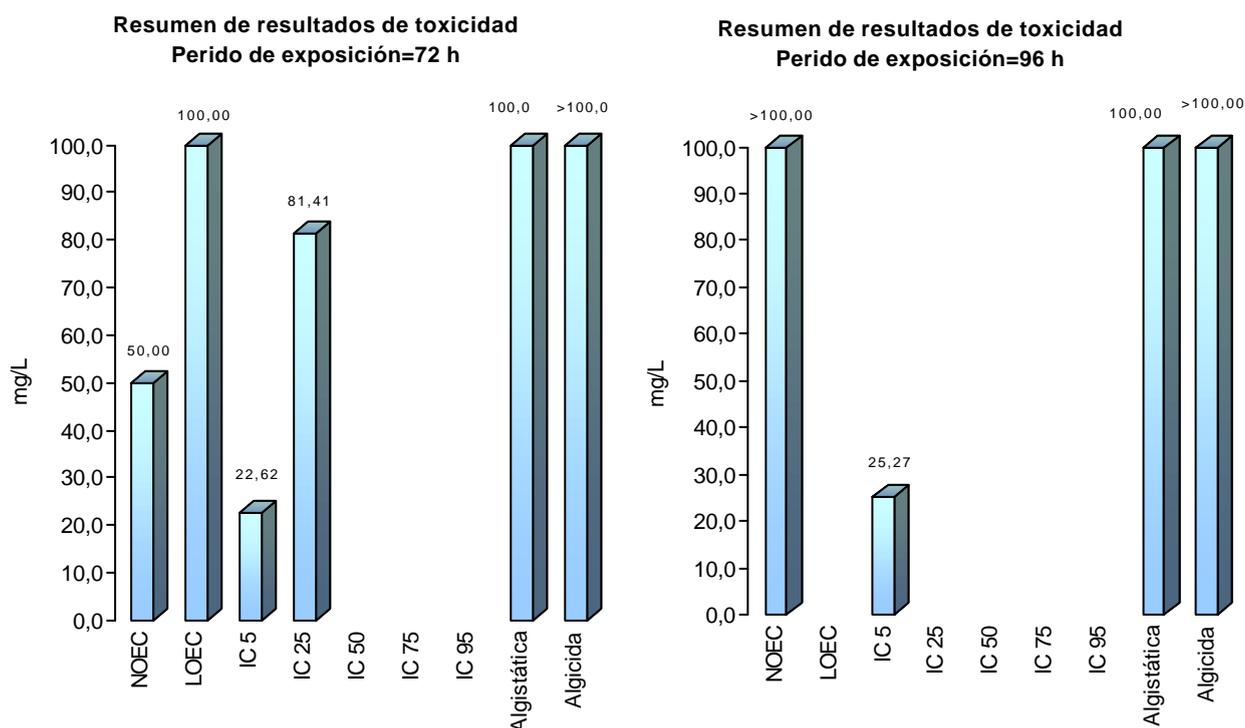
CONCENTRACIÓN ALGUISTÁTICA Y ALGUICIDA

Un inóculo pequeño (0,1 mL) de las cuatro concentraciones más altas de Zn (II) ensayadas con *T. chuii* (100, 50, 25 y 12,5) se incubaron individualmente en medio fresco (medio nutrientes + agua de mar sintética) durante un periodo de tiempo de 10 días. Transcurrido este periodo se observó aumento en la biomasa de todos los viales ensayados. Por lo tanto:

- Concentración alguistática= 100 mg/L
- Concentración alguicida= >100 mg/L

RESUMEN DE RESULTADOS DE TOXICIDAD

De forma gráfica, se resumen los resultados obtenidos en los ensayos de toxicidad del zinc y *T. chuii*.



3. RESULTADOS CON *ARTEMIA*

3.1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Recipiente de ensayo: placas petri de vidrio
- N° de réplicas: 5 para cada concentración y control
- N° de organismos por placa: 10
- Volumen de las placas: 30 mL
- Volumen de solución de ensayo: 20 mL
- Agua de dilución: agua de mar sintética
- Medio nutriente adicional: no
- Temperatura de ensayo: $20 \pm 0,1$ °C
- Iluminación: no, oscuridad
- Aireación: no
- Duración del ensayo: 3 días
- Respuesta observada: mortalidad, inhibición en la capacidad natatoria

ORGANISMOS DE ENSAYO

- *Artemia franciscana*, código 1309 según clasificación del Instituto de la *Artemia*, Bélgica obtenidos a partir de la eclosión de quistes de resistencia en condiciones óptimas de luz (iluminación constante), aireación (continua) y temperatura ($20 \pm 0,1$ °C).
- Nauplios de una misma cohorte de *Artemia franciscana* de entre 6 a 12 horas de vida (estadio I)

RESULTADOS OBTENIDOS

- Número de supervivientes a las 24, 48 y 72 horas de ensayo
- LC_p mediante el método Probit

3.2 RESULTADOS OBTENIDOS

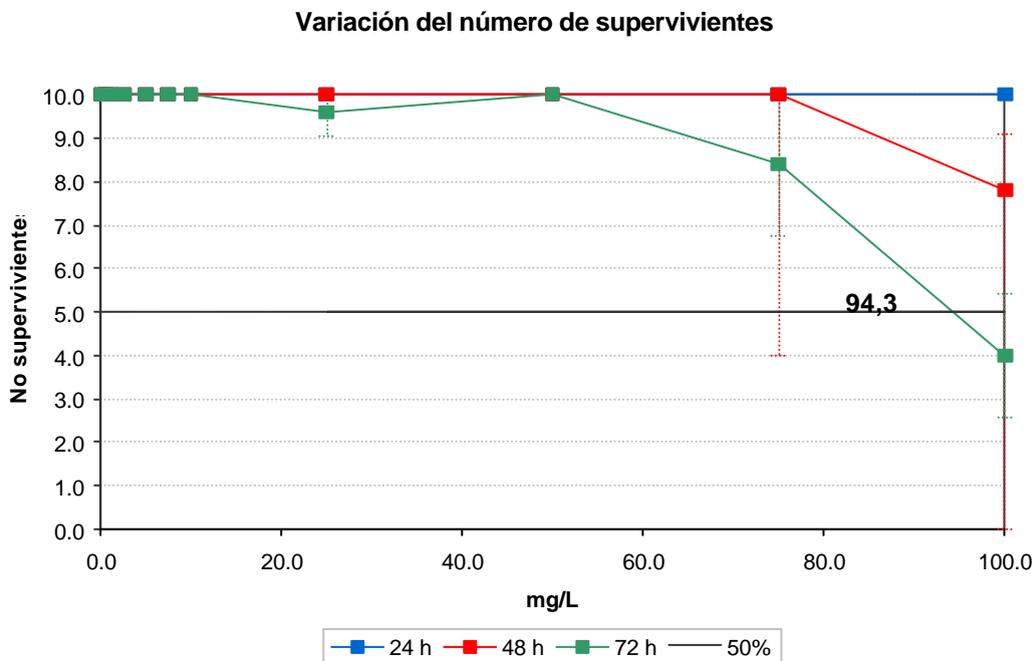
Tabla A VIII.22.
Ensayos de toxicidad aguda con *Artemia*. Ensayo de ZINC (II).

| mg/L Zinc | 24 h | | | 48 h | | | 72 h | | | N Total | |
|-----------|------|----|---|------|----|---|------|----|----|---------|----|
| | + | ± | - | + | ± | - | + | ± | - | | |
| 0,000 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| 0.5 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| 1.0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| 2.5 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| 5.0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| 7.5 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| 10 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| 25 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 9 | 0 | 1 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 9 | 0 | 1 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | |
| 50 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 8 | 2 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 8 | 2 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 8 | 2 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 10 | |
| 75 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 6 | 4 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 8 | 2 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 8 | 2 | 10 | |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 10 |
| | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 0 | 10 | 0 | 10 |
| 100 | 0 | 10 | 0 | 0 | 10 | 0 | 0 | 6 | 4 | 10 | |
| | 0 | 10 | 0 | 0 | 7 | 3 | 0 | 4 | 6 | 10 | |
| | 0 | 10 | 0 | 0 | 8 | 2 | 0 | 4 | 6 | 10 | |
| | 0 | 10 | 0 | 0 | 7 | 3 | 0 | 4 | 6 | 10 | |
| | 0 | 10 | 0 | 0 | 7 | 3 | 0 | 2 | 8 | 10 | |

Tabla A VIII.23.
Promedios de supervivientes. Ensayo de ZINC (II).

| mg/L Zn (II) | 24 h | | 48 h | | 72 h | | Promedio DesvEst |
|--------------|---------|------|---------|------|---------|------|---------------------|
| | + Total | ± | + Total | ± | + Total | ± | |
| 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 0,5 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 1,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 2,5 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 5,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 7,5 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 10,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | |
| 25,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 9,6 | 0,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,55 | 0,00 | |
| 50,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 5,2 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 4,38 | |
| 75,0 | 10,0 | 0,0 | 10,0 | 6,0 | 8,4 | 8,4 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 5,48 | 1,67 | 1,67 | |
| 100,0 | 10,0 | 10,0 | 7,8 | 7,8 | 4,0 | 4,0 | Promedio DesvEst |
| | 0,00 | 0,00 | 1,30 | 1,30 | 1,41 | 1,41 | |

+ Total: Número total de supervivientes; ±: Número de organismos que presentan un descenso en la capacidad natatoria



Las concentraciones incluidas en la zona interior del gráfico muestran los valores de LC₅₀ obtenidos mediante el método de interpolación gráfica.

Tabla A VI.24.
Resultados obtenidos mediante el método PROBIT

| Ensayo de 72 h | Concentración estimada de Zinc (II) (mg/L) | Límites de confianza | |
|----------------|---|----------------------|---------------------|
| | | 95% inferior | 95% superior |
| LC/EC 1,00 | 31,309 | 0,000 | 50,901 |
| LC/EC 5,00 | 44,563 | 0,000 | 62,835 |
| LC/EC 10,00 | 53,791 | 0,011 | 72,020 |
| LC/EC 15,00 | 61,076 | 0,231 | 81,807 |
| LC/EC 50,00 | 104,480 | 78,459 | 183640,500 |
| LC/EC 85,00 | 178,731 | 112,326 | %97808900096,000 |
| LC/EC 90,00 | 202,938 | 120,632 | %2244216094720,000 |
| LC/EC 95,00 | 244,961 | 133,731 | % 233486266,925E+06 |
| LC/EC 99,00 | 348,655 | 161,493 | % 142472916,277E+10 |

χ^2 calculado=34,388; χ^2 teórico($\alpha=0,05$)=15,507. No se cumple la condición de homogeneidad de la varianza. Los resultados hay que interpretarlos con precaución.

4. ENSAYOS CON BACTERIAS LUMINISCENTES

4.1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Condiciones del ensayo LUMISTOX
- N° de réplicas: 2 para cada concentración y control
- Duración del ensayo: 30 minutos
- Respuesta observada: luminiscencia de las bacterias

ORGANISMOS DE ENSAYO

- Bacterias luminiscentes proporcionadas por la marca comercial *Dr. Lange* para el ensayo de LUMISTOX

RESULTADOS OBTENIDOS

- Inhibición de la luminiscencia a t=15 min, y t=30 min.

4.2. RESULTADOS OBTENIDOS

Para el rango de 500 a 1 mg/L de Zn (II) no se han encontrado porcentajes de inhibición significativos para las bacterias luminiscentes.

5. OBJETIVOS DE CALIDAD DEL ZINC (II). TABLAS DE CÁLCULO. RESULTADOS

Tabla A VIII.25. Tabla resumen de los resultados de toxicidad más sensibles (Fact. Seg.=100)

| Resumen de resultados más sensibles de cada grupo de organismos | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos del presente estudio | | | Valor mínimo obtenido a partir del conjunto de datos de toxicidad en agua de mar | | | Valor mínimo obtenidos a partir de la base de datos de toxicidad acuática | | |
|---|---------------------------|---|--------|------|--|-------|------|---|-------|------|
| | | Nº datos | mg/L | x FS | Nº datos | mg/L | x FS | Nº datos | mg/L | x FS |
| Microalgas | NOEC (≤ 96 h) | 9 | 0,195 | | 9 | 0,195 | | 9 | 0,195 | |
| | LOEC (≤ 96 h) | 9 | 0,391 | | 9 | 0,391 | | 9 | 0,391 | |
| | IC ₅₀ (≤ 96 h) | 8 | 11,356 | | 9 | 3,9 | | 13 | 0,2 | |
| Crustáceos | EC ₅₀ (≤ 96 h) | 1 | 104,48 | | 3 | 0,456 | | 6 | 0,095 | |
| | NOEC (≤ 96 h) | | | | | | | 3 | 0,5 | |
| Peces | NOEC (31 d) | | | | | | | 4 | 0,096 | |
| | LOEC (≤ 96 h) | | | | | | | 3 | 2,4 | |
| | LOEC (31 d) | | | | | | | 4 | 0,352 | |
| | EC ₅₀ (≤ 96 h) | | | | 1 | 14,5 | | 10 | 0,79 | |
| | EC ₅₀ (21 d) | | | | | | | 15 | 0,34 | |

Tabla A VIII.26. Valores ecotoxicológicos obtenidos a partir de los valores L(E)C₅₀

| Valor guía obtenido a partir de los valores de L(E)C ₅₀ | Grupo de organismos | Tipo de Respuesta (Aguda o Crónica) | n _i , N | w _i = n _i /N | q _i = Conc- F S | w _i x q _i | Valor Guía = $\sum_{i=1}^n q_i \cdot w_i$ |
|--|---------------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|---|
| Base de datos de toxicidad de este estudio | Algas | A | 8 | 0,8889 | 0,11356 | 0,1009 | 0,2170 mg/L Zn (II) |
| | Crustáceos | A | 1 | 0,1111 | 1,0448 | 0,1161 | |
| | N total de datos | | 9 | | | | |
| Base de datos de toxicidad en agua de mar | Algas | A | 9 | 1,0000 | 0,0039 | 0,0039 | 0,0070 mg/L Zn (II) |
| | Crustáceos | A | 3 | 0,3333 | 0,00456 | 0,0015 | |
| | peces | A | 1 | 0,1111 | 0,0145 | 0,0016 | |
| | N total de datos | | 13 | | | | |
| Base de toxicidad acuática | Algas | A | 13 | 1,4444 | 0,002 | 0,0029 | 0,0690 mg/L Zn (II) |
| | Crustáceos | A | 6 | 0,6667 | 0,00095 | 0,0006 | |
| | peces | A | 10 | 1,1111 | 0,0079 | 0,0088 | |
| | peces | A | 15 | 1,6667 | 0,034 | 0,0567 | |
| | N total de datos | | 44 | | | | |

Tabla A VIII.27. Valores ecotoxicológicos obtenidos a partir de los valores NOEC/LOEC

| Valor guía obtenido a partir de los valores NOEC/LOEC | Grupo de organismos | Tipo de Respuesta (Aguda o Crónica) | n _i , N | w _i = n _i /N | q _i = Conc- F S | w _i x q _i | Valor Guía = $\sum_{i=1}^n q_i \cdot w_i$ |
|---|---------------------|-------------------------------------|--------------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|---|
| Base de datos de toxicidad de este estudio | Algas | A (NOEC) | 9 | 0,5000 | 0,00195 | 0,0010 | 0,0030 mg/L Zn (II) |
| | Algas | A (LOEC) | 9 | 0,5000 | 0,00391 | 0,0020 | |
| | N total de datos | | 18 | | | | |
| Base de datos de toxicidad en agua de mar | Algas | A (NOEC) | 9 | 0,5000 | 0,00195 | 0,0010 | 0,0030 mg/L Zn (II) |
| | Algas | A (LOEC) | 9 | 0,5000 | 0,00391 | 0,0020 | |
| | N total de datos | | 18 | | | | |
| Base de toxicidad acuática | Algas | A (NOEC) | 9 | 0,5000 | 0,00195 | 0,0010 | 0,0177 mg/L Zn (II) |
| | Algas | A (LOEC) | 9 | 0,5000 | 0,00391 | 0,0020 | |
| | peces | A (NOEC) | 3 | 0,1667 | 0,005 | 0,0008 | |
| | peces | C (NOEC) | 4 | 0,2222 | 0,0096 | 0,0021 | |
| | peces | A (LOEC) | 3 | 0,1667 | 0,024 | 0,0040 | |
| | peces | C (LOEC) | 4 | 0,2222 | 0,0352 | 0,0078 | |
| N total de datos | | 32 | | | | | |

ANEXO IX. TOXICIDAD DEL LAS EN DIFERENTES AGUAS RECEPTORAS

1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Volumen de los viales de ensayo: 15 mL
- Volumen de solución de ensayo: 4 mL
- Agua de dilución: ver tabla
- Medio nutriente adicional: ver tabla
- Temperatura de ensayo: $20 \pm 0,1$ °C
- Iluminación: constante, 11000 lux
- Aireación: diaria -de forma manual-
- Duración del ensayo: 4 días (96 h)
- Medidas de biomasa: turbidez, a $\lambda = 690$ nm

MICROALGAS ENSAYADAS

- *Isochrysis galbana*

RESULTADOS OBTENIDOS

- Valores de biomasa (Abs, 690 nm) de cada tratamiento
- Valores experimentales de NOEC y LOEC
- Valores experimentales de inhibición calculados a partir del ICp programa (Las indicaciones inferiores de la tablas (*) está referida a indicaciones realizadas por el programa)

Tabla A IX.1.
Resumen de los ensayos de toxicidad del LAS y aguas receptoras. Tipos de agua de dilución y condiciones nutricionales

| <u>Ensayo de toxicidad</u> | <u>Agua de dilución</u> | | <u>Condiciones nutricionales</u> | |
|--|--|---|---|--|
| | Agua de mar sintética | Disolución de sales comerciales según la fórmula de la USEPA (Weber, 1994) | Con adición de medio nutriente | Concentración de nutrientes según la fórmula del medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) |
| | | | Sin adición de medio nutrientes | Concentración de nutrientes residual presente en el inóculo de ensayo |
| | Agua procedente de la Ría de Huelva | H*=Muestra compuesta formada por volúmenes iguales de H1, H2 y H3 | Con adición de medio nutriente | Concentración de nutrientes según la fórmula del medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) |
| | | | Sin adición de nutrientes (condiciones naturales) | Concentración de nutrientes de la muestra compuesta (Tabla A IX.1.2) |
| Ensayo de toxicidad del tensioactivo aniónico LAS y la microalga marina <i>Isochrysis galbana</i> | Agua procedente de la Bahía de Cádiz | C*=Muestra compuesta formada por volúmenes iguales de C1, C2, C3 y C4 | Con adición de medio nutriente | Concentración de nutrientes según la fórmula del medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) |
| | | | Sin adición de nutrientes | Concentración de nutrientes de la muestra compuesta (Tabla A IX.1.2) |
| | Agua procedente del río Iro | Al*=Muestra compuesta formada por volúmenes iguales de Al1, Al2 y Al3 | Con adición de medio nutriente | Concentración de nutrientes según la fórmula del medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) |
| | | | Sin adición de nutrientes | Concentración de nutrientes de la muestra compuesta (Tabla A IX.1.2) |
| | Agua procedente de la Bahía de Algeciras | I*=Muestra compuesta formada por volúmenes iguales de I2, I4, I5, I6, I7 e I8 | Con adición de medio nutriente | Concentración de nutrientes según la fórmula del medio f/2 (Guillard y Ryther, 1962) |
| | | | Sin adición de nutrientes | Concentración de nutrientes de la muestra compuesta (Tabla A IX.1.2) |

Tabla A IX.2.
Niveles de nutrientes medidos en las aguas de dilución

| <i>Nutrientes</i> | <i>Ría de Huelva</i> | <i>Bahía de Cádiz</i> | <i>Río Iro</i> | <i>Bahía de Algeciras</i> |
|-------------------|----------------------|-----------------------|----------------|---------------------------|
| C (mg/L) | 27,45 | 31,17 | 44,03 | 30,21 |
| N (mg/L) | 0,172 | 0,109 | 2,402 | 0,302 |
| P (mg/L) | 0,057 | 0,013 | 0,463 | 0,004 |
| Si (mg/L) | 0,046 | 0,120 | 0,372 | 0,070 |

2. RESULTADOS

2.1. Toxicidad del LAS en agua de mar sintética

Tabla A IX.3.

Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de LAS en agua de mar sintética. Ensayo CON suplemento de nutrientes.

| <i>I. galbana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|-------|-------|-------|-------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | |
| 0 | 0,308 | 0,387 | 0,573 | 0,700 | 0,800 | 0,000 | 0,079 | 0,265 | 0,392 | 0,492 | |
| | 0,309 | 0,385 | 0,554 | 0,691 | 0,812 | 0,000 | 0,076 | 0,245 | 0,382 | 0,503 | |
| | 0,318 | 0,373 | 0,544 | 0,702 | 0,822 | 0,000 | 0,055 | 0,226 | 0,384 | 0,504 | |
| 2 | 0,284 | 0,373 | 0,552 | 0,686 | 0,777 | 0,000 | 0,089 | 0,268 | 0,402 | 0,493 | |
| | 0,297 | 0,373 | 0,536 | 0,683 | 0,808 | 0,000 | 0,076 | 0,239 | 0,386 | 0,511 | |
| | 0,285 | 0,344 | 0,494 | 0,667 | 0,808 | 0,000 | 0,059 | 0,209 | 0,382 | 0,523 | |
| 4 | 0,296 | 0,359 | 0,534 | 0,654 | 0,756 | 0,000 | 0,063 | 0,238 | 0,358 | 0,460 | |
| | 0,307 | 0,369 | 0,528 | 0,669 | 0,788 | 0,000 | 0,062 | 0,221 | 0,362 | 0,481 | |
| | 0,276 | 0,324 | 0,472 | 0,623 | 0,750 | 0,000 | 0,048 | 0,196 | 0,347 | 0,474 | |
| 6 | 0,306 | 0,367 | 0,530 | 0,660 | 0,767 | 0,000 | 0,061 | 0,224 | 0,354 | 0,461 | |
| | 0,279 | 0,321 | 0,474 | 0,606 | 0,710 | 0,000 | 0,042 | 0,195 | 0,327 | 0,431 | |
| | 0,296 | 0,325 | 0,458 | 0,588 | 0,710 | 0,000 | 0,029 | 0,162 | 0,292 | 0,414 | |
| 8 | 0,294 | 0,335 | 0,491 | 0,609 | 0,710 | 0,000 | 0,041 | 0,197 | 0,315 | 0,416 | |
| | 0,318 | 0,354 | 0,485 | 0,617 | 0,732 | 0,000 | 0,036 | 0,167 | 0,299 | 0,414 | |
| | 0,316 | 0,341 | 0,469 | 0,604 | 0,711 | 0,000 | 0,025 | 0,153 | 0,288 | 0,395 | |
| 10 | 0,296 | 0,323 | 0,426 | 0,545 | 0,648 | 0,000 | 0,027 | 0,130 | 0,249 | 0,352 | |
| | 0,315 | 0,342 | 0,448 | 0,568 | 0,666 | 0,000 | 0,027 | 0,133 | 0,253 | 0,351 | |
| | 0,294 | 0,319 | 0,408 | 0,526 | 0,624 | 0,000 | 0,025 | 0,114 | 0,232 | 0,330 | |

Tabla A IX.4.

Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de LAS en agua de mar sintética. Ensayo SIN suplemento de nutrientes.

| <i>I. galbana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|-------|-------|-------|-------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | |
| 0 | 0,308 | 0,361 | 0,382 | 0,415 | 0,422 | 0,000 | 0,053 | 0,074 | 0,107 | 0,114 | |
| | 0,270 | 0,322 | 0,348 | 0,382 | 0,376 | 0,000 | 0,052 | 0,078 | 0,112 | 0,106 | |
| | 0,311 | 0,359 | 0,381 | 0,410 | 0,421 | 0,000 | 0,048 | 0,070 | 0,099 | 0,110 | |
| 2 | 0,294 | 0,335 | 0,367 | 0,391 | 0,409 | 0,000 | 0,041 | 0,073 | 0,097 | 0,115 | |
| | 0,321 | 0,355 | 0,381 | 0,399 | 0,404 | 0,000 | 0,034 | 0,060 | 0,078 | 0,083 | |
| | 0,297 | 0,333 | 0,369 | 0,385 | 0,405 | 0,000 | 0,036 | 0,072 | 0,088 | 0,108 | |
| 4 | 0,306 | 0,357 | 0,380 | 0,409 | 0,416 | 0,000 | 0,051 | 0,074 | 0,103 | 0,110 | |
| | 0,309 | 0,345 | 0,376 | 0,397 | 0,412 | 0,000 | 0,036 | 0,067 | 0,088 | 0,103 | |
| | 0,307 | 0,348 | 0,364 | 0,387 | 0,405 | 0,000 | 0,041 | 0,057 | 0,080 | 0,098 | |
| 6 | 0,283 | 0,331 | 0,354 | 0,366 | 0,373 | 0,000 | 0,048 | 0,071 | 0,083 | 0,090 | |
| | 0,292 | 0,339 | 0,361 | 0,370 | 0,380 | 0,000 | 0,047 | 0,069 | 0,078 | 0,088 | |
| | 0,318 | 0,351 | 0,370 | 0,384 | 0,391 | 0,000 | 0,033 | 0,052 | 0,066 | 0,073 | |
| 8 | 0,324 | 0,371 | 0,373 | 0,384 | 0,385 | 0,000 | 0,047 | 0,049 | 0,060 | 0,061 | |
| | 0,315 | 0,343 | 0,359 | 0,368 | 0,389 | 0,000 | 0,028 | 0,044 | 0,053 | 0,074 | |
| | 0,312 | 0,339 | 0,353 | 0,338 | 0,365 | 0,000 | 0,027 | 0,041 | 0,026 | 0,053 | |
| 10 | 0,324 | 0,344 | 0,353 | 0,356 | 0,351 | 0,000 | 0,020 | 0,029 | 0,032 | 0,027 | |
| | 0,300 | 0,327 | 0,333 | 0,330 | 0,326 | 0,000 | 0,027 | 0,033 | 0,030 | 0,026 | |
| | 0,294 | 0,328 | 0,329 | 0,337 | 0,322 | 0,000 | 0,034 | 0,035 | 0,043 | 0,028 | |

2.2. Toxicidad del LAS en aguas de la Ría de Huelva

Tabla A IX.5.

Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de LAS en agua de la Ría de Huelva. Ensayo CON suplemento de nutrientes.

| <i>I. galbana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|-------|-------|-------|-------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | |
| 0 | 0,330 | 0,397 | 0,530 | 0,654 | 0,768 | 0,000 | 0,067 | 0,200 | 0,324 | 0,438 | |
| | 0,304 | 0,361 | 0,512 | 0,648 | 0,768 | 0,000 | 0,057 | 0,208 | 0,344 | 0,464 | |
| | 0,315 | 0,352 | 0,498 | 0,641 | 0,767 | 0,000 | 0,037 | 0,183 | 0,326 | 0,452 | |
| 2 | 0,331 | 0,383 | 0,532 | 0,673 | 0,799 | 0,000 | 0,052 | 0,201 | 0,342 | 0,468 | |
| | 0,314 | 0,352 | 0,510 | 0,640 | 0,766 | 0,000 | 0,038 | 0,196 | 0,326 | 0,452 | |
| | 0,327 | 0,367 | 0,522 | 0,677 | 0,817 | 0,000 | 0,040 | 0,195 | 0,350 | 0,490 | |
| 4 | 0,321 | 0,374 | 0,518 | 0,638 | 0,750 | 0,000 | 0,053 | 0,197 | 0,317 | 0,429 | |
| | 0,318 | 0,349 | 0,496 | 0,636 | 0,748 | 0,000 | 0,031 | 0,178 | 0,318 | 0,430 | |
| | 0,314 | 0,357 | 0,494 | 0,641 | 0,761 | 0,000 | 0,043 | 0,180 | 0,327 | 0,447 | |
| 6 | 0,323 | 0,370 | 0,515 | 0,642 | 0,755 | 0,000 | 0,047 | 0,192 | 0,319 | 0,432 | |
| | 0,306 | 0,347 | 0,504 | 0,639 | 0,736 | 0,000 | 0,041 | 0,198 | 0,333 | 0,430 | |
| | 0,304 | 0,346 | 0,490 | 0,628 | 0,760 | 0,000 | 0,042 | 0,186 | 0,324 | 0,456 | |
| 8 | 0,333 | 0,393 | 0,539 | 0,633 | 0,758 | 0,000 | 0,160 | 0,306 | 0,300 | 0,425 | |
| | 0,329 | 0,365 | 0,495 | 0,625 | 0,742 | 0,000 | 0,036 | 0,166 | 0,296 | 0,413 | |
| | 0,310 | 0,332 | 0,452 | 0,595 | 0,711 | 0,000 | 0,022 | 0,142 | 0,285 | 0,401 | |
| 10 | 0,334 | 0,367 | 0,487 | 0,588 | 0,717 | 0,000 | 0,033 | 0,153 | 0,254 | 0,383 | |
| | 0,312 | 0,330 | 0,463 | 0,553 | 0,660 | 0,000 | 0,018 | 0,151 | 0,241 | 0,348 | |
| | 0,335 | 0,351 | 0,459 | 0,590 | 0,717 | 0,000 | 0,016 | 0,124 | 0,255 | 0,382 | |

Tabla A IX.6.

Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de LAS en aguas de la Ría de Huelva. Ensayo SIN suplemento de nutrientes.

| <i>I. galbana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|-------|-------|-------|-------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | |
| 0 | 0,317 | 0,345 | 0,384 | 0,413 | 0,418 | 0,000 | 0,028 | 0,067 | 0,096 | 0,101 | |
| | 0,296 | 0,328 | 0,358 | 0,394 | 0,401 | 0,000 | 0,032 | 0,062 | 0,098 | 0,105 | |
| | 0,300 | 0,325 | 0,366 | 0,388 | 0,406 | 0,000 | 0,025 | 0,066 | 0,088 | 0,106 | |
| 2 | 0,328 | 0,357 | 0,392 | 0,418 | 0,412 | 0,000 | 0,029 | 0,064 | 0,090 | 0,084 | |
| | 0,315 | 0,339 | 0,365 | 0,384 | 0,397 | 0,000 | 0,024 | 0,050 | 0,069 | 0,082 | |
| | 0,325 | 0,345 | 0,368 | 0,406 | 0,393 | 0,000 | 0,020 | 0,043 | 0,081 | 0,068 | |
| 4 | 0,329 | 0,356 | 0,372 | 0,403 | 0,406 | 0,000 | 0,027 | 0,043 | 0,074 | 0,077 | |
| | 0,322 | 0,336 | 0,366 | 0,382 | 0,396 | 0,000 | 0,014 | 0,044 | 0,060 | 0,074 | |
| | 0,317 | 0,342 | 0,368 | 0,389 | 0,392 | 0,000 | 0,025 | 0,051 | 0,072 | 0,075 | |
| 6 | 0,316 | 0,345 | 0,358 | 0,378 | 0,385 | 0,000 | 0,029 | 0,042 | 0,062 | 0,069 | |
| | 0,325 | 0,349 | 0,362 | 0,386 | 0,388 | 0,000 | 0,024 | 0,037 | 0,061 | 0,063 | |
| | 0,319 | 0,340 | 0,364 | 0,378 | 0,383 | 0,000 | 0,021 | 0,045 | 0,059 | 0,064 | |
| 8 | 0,323 | 0,335 | 0,353 | 0,362 | 0,369 | 0,000 | 0,012 | 0,030 | 0,039 | 0,046 | |
| | 0,309 | 0,333 | 0,345 | 0,367 | 0,369 | 0,000 | 0,024 | 0,036 | 0,058 | 0,060 | |
| | 0,319 | 0,342 | 0,337 | 0,346 | 0,334 | 0,000 | 0,023 | 0,018 | 0,027 | 0,040 | |
| 10 | 0,331 | 0,346 | 0,347 | 0,353 | 0,347 | 0,000 | 0,015 | 0,016 | 0,022 | 0,016 | |
| | 0,306 | 0,320 | 0,325 | 0,337 | 0,333 | 0,000 | 0,014 | 0,019 | 0,031 | 0,027 | |
| | 0,334 | 0,345 | 0,338 | 0,342 | 0,330 | 0,000 | 0,011 | 0,004 | 0,008 | 0,010 | |

2.3. Toxicidad del LAS en aguas de la Bahía de Cádiz

Tabla A IX.7.

Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de LAS en aguas de la Bahía de Cádiz. Ensayo CON suplemento de nutrientes.

| <i>I. galbana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|-------|-------|-------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | |
| 0 | 0,337 | 0,352 | 0,521 | 0,643 | 0,758 | 0,000 | 0,015 | 0,184 | 0,306 | 0,421 | |
| | 0,320 | 0,350 | 0,484 | 0,591 | 0,709 | 0,000 | 0,030 | 0,164 | 0,271 | 0,389 | |
| | 0,345 | 0,367 | 0,510 | 0,650 | 0,784 | 0,000 | 0,022 | 0,165 | 0,305 | 0,439 | |
| 2 | 0,356 | 0,378 | 0,504 | 0,616 | 0,729 | 0,000 | 0,022 | 0,148 | 0,260 | 0,373 | |
| | 0,352 | 0,369 | 0,509 | 0,655 | 0,821 | 0,000 | 0,017 | 0,157 | 0,303 | 0,469 | |
| | 0,349 | 0,355 | 0,494 | 0,642 | 0,778 | 0,000 | 0,006 | 0,145 | 0,293 | 0,429 | |
| 4 | 0,337 | 0,355 | 0,500 | 0,622 | 0,727 | 0,000 | 0,018 | 0,163 | 0,285 | 0,390 | |
| | 0,357 | 0,365 | 0,507 | 0,632 | 0,767 | 0,000 | 0,008 | 0,150 | 0,275 | 0,410 | |
| | 0,359 | 0,366 | 0,492 | 0,623 | 0,736 | 0,000 | 0,007 | 0,133 | 0,264 | 0,377 | |
| 6 | 0,353 | 0,360 | 0,508 | 0,612 | 0,719 | 0,000 | 0,007 | 0,155 | 0,259 | 0,366 | |
| | 0,357 | 0,360 | 0,502 | 0,632 | 0,752 | 0,000 | 0,003 | 0,145 | 0,275 | 0,395 | |
| | 0,343 | 0,353 | 0,485 | 0,617 | 0,731 | 0,000 | 0,010 | 0,142 | 0,274 | 0,388 | |
| 8 | 0,360 | 0,370 | 0,493 | 0,599 | 0,703 | 0,000 | 0,010 | 0,133 | 0,239 | 0,343 | |
| | 0,363 | 0,359 | 0,473 | 0,592 | 0,709 | 0,000 | -0,004 | 0,110 | 0,229 | 0,346 | |
| | 0,350 | 0,345 | 0,457 | 0,586 | 0,707 | 0,000 | -0,005 | 0,107 | 0,236 | 0,357 | |
| 10 | 0,352 | 0,354 | 0,440 | 0,538 | 0,619 | 0,000 | 0,002 | 0,088 | 0,186 | 0,267 | |
| | 0,353 | 0,342 | 0,410 | 0,499 | 0,575 | 0,000 | -0,011 | 0,057 | 0,146 | 0,222 | |
| | 0,360 | 0,350 | 0,407 | 0,510 | 0,613 | 0,000 | -0,010 | 0,047 | 0,150 | 0,253 | |

Tabla A IX.8.

Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de LAS en aguas de la Bahía de Cádiz. Ensayo SIN suplemento de nutrientes.

| <i>I. galbana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|--------|--------|-------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | |
| 0 | 0,337 | 0,338 | 0,376 | 0,404 | 0,400 | 0,000 | 0,001 | 0,039 | 0,067 | 0,063 | |
| | 0,355 | 0,359 | 0,386 | 0,418 | 0,436 | 0,000 | 0,004 | 0,031 | 0,063 | 0,081 | |
| | 0,375 | 0,364 | 0,395 | 0,425 | 0,438 | 0,000 | -0,011 | 0,020 | 0,050 | 0,063 | |
| 2 | 0,347 | 0,345 | 0,374 | 0,398 | 0,410 | 0,000 | -0,002 | 0,027 | 0,051 | 0,063 | |
| | 0,367 | 0,359 | 0,383 | 0,415 | 0,422 | 0,000 | -0,008 | 0,016 | 0,048 | 0,055 | |
| | 0,363 | 0,361 | 0,389 | 0,421 | 0,435 | 0,000 | -0,002 | 0,026 | 0,058 | 0,072 | |
| 4 | 0,328 | 0,331 | 0,360 | 0,377 | 0,393 | 0,000 | 0,003 | 0,032 | 0,049 | 0,065 | |
| | 0,345 | 0,345 | 0,363 | 0,382 | 0,398 | 0,000 | 0,000 | 0,018 | 0,037 | 0,053 | |
| | 0,326 | 0,332 | 0,352 | 0,376 | 0,387 | 0,000 | 0,006 | 0,026 | 0,050 | 0,061 | |
| 6 | 0,346 | 0,340 | 0,356 | 0,383 | 0,399 | 0,000 | -0,006 | 0,010 | 0,037 | 0,053 | |
| | 0,362 | 0,356 | 0,379 | 0,405 | 0,407 | 0,000 | -0,006 | 0,017 | 0,043 | 0,045 | |
| | 0,342 | 0,340 | 0,366 | 0,392 | 0,406 | 0,000 | -0,002 | 0,024 | 0,050 | 0,064 | |
| 8 | 0,352 | 0,334 | 0,352 | 0,368 | 0,375 | 0,000 | -0,018 | 0,000 | 0,016 | 0,023 | |
| | 0,367 | 0,355 | 0,386 | 0,400 | 0,406 | 0,000 | -0,012 | 0,019 | 0,033 | 0,039 | |
| | 0,349 | 0,341 | 0,366 | 0,392 | 0,399 | 0,000 | -0,008 | 0,017 | 0,043 | 0,050 | |
| 10 | 0,344 | 0,334 | 0,356 | 0,366 | 0,365 | 0,000 | -0,010 | 0,012 | 0,022 | 0,021 | |
| | 0,344 | 0,330 | 0,356 | 0,370 | 0,357 | 0,000 | -0,014 | 0,012 | 0,026 | 0,013 | |
| | 0,353 | 0,339 | 0,351 | 0,350 | 0,363 | 0,000 | -0,014 | -0,002 | -0,003 | 0,010 | |

2.4. Toxicidad del LAS en aguas del Río Iro

Tabla A IX.9.

Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de LAS en aguas del río Iro. Ensayo CON suplemento de nutrientes.

| <i>I. galbana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|-------|-------|-------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | |
| 0 | 0,392 | 0,376 | 0,487 | 0,579 | 0,673 | 0,000 | -0,016 | 0,095 | 0,187 | 0,281 | |
| | 0,412 | 0,387 | 0,514 | 0,619 | 0,699 | 0,000 | -0,025 | 0,102 | 0,207 | 0,287 | |
| | 0,407 | 0,381 | 0,512 | 0,622 | 0,719 | 0,000 | -0,026 | 0,105 | 0,215 | 0,312 | |
| 2 | 0,384 | 0,372 | 0,510 | 0,633 | 0,742 | 0,000 | -0,012 | 0,126 | 0,249 | 0,358 | |
| | 0,407 | 0,385 | 0,505 | 0,624 | 0,734 | 0,000 | -0,022 | 0,098 | 0,217 | 0,327 | |
| | 0,394 | 0,375 | 0,486 | 0,604 | 0,684 | 0,000 | -0,019 | 0,092 | 0,210 | 0,290 | |
| 4 | 0,379 | 0,367 | 0,488 | 0,607 | 0,721 | 0,000 | -0,012 | 0,109 | 0,228 | 0,342 | |
| | 0,383 | 0,360 | 0,490 | 0,607 | 0,722 | 0,000 | -0,023 | 0,107 | 0,224 | 0,339 | |
| | 0,406 | 0,376 | 0,498 | 0,611 | 0,716 | 0,000 | -0,030 | 0,092 | 0,205 | 0,310 | |
| 6 | 0,388 | 0,367 | 0,491 | 0,590 | 0,680 | 0,000 | -0,021 | 0,103 | 0,202 | 0,292 | |
| | 0,377 | 0,361 | 0,487 | 0,595 | 0,695 | 0,000 | -0,016 | 0,110 | 0,218 | 0,318 | |
| | 0,389 | 0,350 | 0,476 | 0,595 | 0,699 | 0,000 | -0,039 | 0,087 | 0,206 | 0,310 | |
| 8 | 0,409 | 0,399 | 0,507 | 0,597 | 0,673 | 0,000 | -0,010 | 0,098 | 0,188 | 0,264 | |
| | 0,371 | 0,330 | 0,444 | 0,579 | 0,692 | 0,000 | -0,041 | 0,073 | 0,208 | 0,321 | |
| | 0,381 | 0,340 | 0,454 | 0,557 | 0,638 | 0,000 | -0,041 | 0,073 | 0,176 | 0,257 | |
| 10 | 0,392 | 0,337 | 0,434 | 0,522 | 0,616 | 0,000 | -0,055 | 0,042 | 0,130 | 0,224 | |
| | 0,372 | 0,348 | 0,461 | 0,566 | 0,648 | 0,000 | -0,024 | 0,089 | 0,194 | 0,276 | |
| | 0,362 | 0,330 | 0,434 | 0,551 | 0,637 | 0,000 | -0,032 | 0,072 | 0,189 | 0,275 | |

Tabla A IX.10.

Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de LAS en aguas del río Iro. Ensayo SIN suplemento de nutrientes.

| <i>I. galbana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|-------|-------|-------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | |
| 0 | 0,398 | 0,383 | 0,449 | 0,525 | 0,563 | 0,000 | -0,015 | 0,051 | 0,127 | 0,165 | |
| | 0,406 | 0,386 | 0,471 | 0,554 | 0,583 | 0,000 | -0,020 | 0,065 | 0,148 | 0,177 | |
| | 0,399 | 0,375 | 0,431 | 0,505 | 0,550 | 0,000 | -0,024 | 0,032 | 0,106 | 0,151 | |
| 2 | 0,405 | 0,378 | 0,441 | 0,517 | 0,552 | 0,000 | -0,027 | 0,036 | 0,112 | 0,147 | |
| | 0,407 | 0,383 | 0,437 | 0,510 | 0,543 | 0,000 | -0,024 | 0,030 | 0,103 | 0,136 | |
| | 0,402 | 0,374 | 0,434 | 0,505 | 0,554 | 0,000 | -0,028 | 0,032 | 0,103 | 0,152 | |
| 4 | 0,380 | 0,379 | 0,451 | 0,523 | 0,559 | 0,000 | -0,001 | 0,071 | 0,143 | 0,179 | |
| | 0,378 | 0,346 | 0,429 | 0,503 | 0,559 | 0,000 | -0,032 | 0,051 | 0,125 | 0,181 | |
| | 0,369 | 0,347 | 0,468 | 0,575 | 0,633 | 0,000 | -0,022 | 0,099 | 0,206 | 0,264 | |
| 6 | 0,406 | 0,376 | 0,444 | 0,502 | 0,540 | 0,000 | -0,030 | 0,038 | 0,096 | 0,134 | |
| | 0,378 | 0,361 | 0,417 | 0,504 | 0,536 | 0,000 | -0,017 | 0,039 | 0,126 | 0,158 | |
| | 0,406 | 0,374 | 0,440 | 0,517 | 0,582 | 0,000 | -0,032 | 0,034 | 0,111 | 0,176 | |
| 8 | 0,397 | 0,361 | 0,442 | 0,505 | 0,534 | 0,000 | -0,036 | 0,045 | 0,108 | 0,137 | |
| | 0,395 | 0,371 | 0,485 | 0,583 | 0,639 | 0,000 | -0,024 | 0,090 | 0,188 | 0,244 | |
| | 0,413 | 0,376 | 0,441 | 0,505 | 0,551 | 0,000 | -0,037 | 0,028 | 0,092 | 0,138 | |
| 10 | 0,404 | 0,368 | 0,437 | 0,484 | 0,501 | 0,000 | -0,036 | 0,033 | 0,080 | 0,097 | |
| | 0,399 | 0,358 | 0,420 | 0,438 | 0,443 | 0,000 | -0,041 | 0,021 | 0,039 | 0,044 | |
| | 0,386 | 0,343 | 0,420 | 0,489 | 0,536 | 0,000 | -0,043 | 0,034 | 0,103 | 0,150 | |

2.5. Toxicidad del LAS en aguas de la Bahía de Algeciras

Tabla A IX.11.

Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de LAS en aguas de la Bahía de Algeciras. Ensayo CON suplemento de nutrientes.

| <i>I. galbana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|-------|-------|-------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | |
| 0 | 0,358 | 0,361 | 0,478 | 0,587 | 0,683 | 0,000 | 0,003 | 0,120 | 0,229 | 0,325 | |
| | 0,378 | 0,361 | 0,472 | 0,589 | 0,689 | 0,000 | -0,017 | 0,094 | 0,211 | 0,311 | |
| | 0,360 | 0,340 | 0,461 | 0,573 | 0,684 | 0,000 | -0,020 | 0,101 | 0,213 | 0,324 | |
| 2 | 0,376 | 0,366 | 0,483 | 0,609 | 0,719 | 0,000 | -0,010 | 0,107 | 0,233 | 0,343 | |
| | 0,367 | 0,353 | 0,463 | 0,587 | 0,718 | 0,000 | -0,014 | 0,096 | 0,220 | 0,351 | |
| | 0,363 | 0,341 | 0,454 | 0,610 | 0,750 | 0,000 | -0,022 | 0,091 | 0,247 | 0,387 | |
| 4 | 0,369 | 0,351 | 0,479 | 0,601 | 0,708 | 0,000 | -0,018 | 0,110 | 0,232 | 0,339 | |
| | 0,373 | 0,352 | 0,471 | 0,600 | 0,702 | 0,000 | -0,021 | 0,098 | 0,227 | 0,329 | |
| | 0,348 | 0,330 | 0,472 | 0,582 | 0,704 | 0,000 | -0,018 | 0,124 | 0,234 | 0,356 | |
| 6 | 0,368 | 0,352 | 0,470 | 0,599 | 0,715 | 0,000 | -0,016 | 0,102 | 0,231 | 0,347 | |
| | 0,344 | 0,321 | 0,432 | 0,557 | 0,669 | 0,000 | -0,023 | 0,088 | 0,213 | 0,325 | |
| | 0,377 | 0,352 | 0,465 | 0,604 | 0,728 | 0,000 | -0,025 | 0,088 | 0,227 | 0,351 | |
| 8 | 0,382 | 0,358 | 0,442 | 0,556 | 0,661 | 0,000 | -0,024 | 0,060 | 0,174 | 0,279 | |
| | 0,362 | 0,328 | 0,424 | 0,545 | 0,640 | 0,000 | -0,034 | 0,062 | 0,183 | 0,278 | |
| | 0,382 | 0,352 | 0,440 | 0,588 | 0,693 | 0,000 | -0,030 | 0,058 | 0,206 | 0,311 | |
| 10 | 0,379 | 0,352 | 0,426 | 0,522 | 0,619 | 0,000 | -0,027 | 0,047 | 0,143 | 0,240 | |
| | 0,395 | 0,349 | 0,438 | 0,554 | 0,658 | 0,000 | -0,046 | 0,043 | 0,159 | 0,263 | |
| | 0,389 | 0,353 | 0,429 | 0,557 | 0,652 | 0,000 | -0,036 | 0,040 | 0,168 | 0,263 | |

Tabla A IX.12.

Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de LAS en aguas de la Bahía de Algeciras. Ensayo SIN suplemento de nutrientes.

| <i>I. galbana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | Abs' = Abs t – Abs t=0 | | | | | |
|---|-------|-------|-------|-------|-------|------------------------|--------|--------|--------|--------|--|
| t(d) | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | |
| t(h) | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | |
| 0 | 0,383 | 0,350 | 0,379 | 0,406 | 0,416 | 0,000 | -0,033 | -0,004 | 0,023 | 0,033 | |
| | 0,365 | 0,349 | 0,369 | 0,430 | 0,401 | 0,000 | -0,016 | 0,004 | 0,065 | 0,036 | |
| | 0,360 | 0,333 | 0,359 | 0,391 | 0,399 | 0,000 | -0,027 | -0,001 | 0,031 | 0,039 | |
| 2 | 0,397 | 0,358 | 0,385 | 0,420 | 0,408 | 0,000 | -0,039 | -0,012 | 0,023 | 0,011 | |
| | 0,373 | 0,335 | 0,356 | 0,385 | 0,393 | 0,000 | -0,038 | -0,017 | 0,012 | 0,020 | |
| | 0,370 | 0,343 | 0,374 | 0,417 | 0,403 | 0,000 | -0,027 | 0,004 | 0,047 | 0,033 | |
| 4 | 0,364 | 0,335 | 0,358 | 0,381 | 0,389 | 0,000 | -0,029 | -0,006 | 0,017 | 0,025 | |
| | 0,397 | 0,355 | 0,380 | 0,400 | 0,405 | 0,000 | -0,042 | -0,017 | 0,003 | 0,008 | |
| | 0,369 | 0,332 | 0,362 | 0,377 | 0,386 | 0,000 | -0,037 | -0,007 | 0,008 | 0,017 | |
| 6 | 0,384 | 0,345 | 0,354 | 0,385 | 0,364 | 0,000 | -0,039 | -0,030 | 0,001 | -0,020 | |
| | 0,360 | 0,335 | 0,342 | 0,364 | 0,368 | 0,000 | -0,025 | -0,018 | 0,004 | 0,008 | |
| | 0,359 | 0,321 | 0,334 | 0,353 | 0,356 | 0,000 | -0,038 | -0,025 | -0,006 | -0,003 | |
| 8 | 0,378 | 0,333 | 0,350 | 0,359 | 0,362 | 0,000 | -0,045 | -0,028 | -0,019 | -0,016 | |
| | 0,386 | 0,337 | 0,343 | 0,362 | 0,369 | 0,000 | -0,049 | -0,043 | -0,024 | -0,017 | |
| | 0,352 | 0,324 | 0,330 | 0,353 | 0,353 | 0,000 | -0,028 | -0,022 | 0,001 | 0,001 | |
| 10 | 0,389 | 0,339 | 0,340 | 0,339 | 0,332 | 0,000 | -0,050 | -0,049 | -0,050 | -0,057 | |
| | 0,364 | 0,323 | 0,316 | 0,329 | 0,315 | 0,000 | -0,041 | -0,048 | -0,035 | -0,049 | |
| | 0,360 | 0,320 | 0,325 | 0,333 | 0,323 | 0,000 | -0,040 | -0,035 | -0,027 | -0,037 | |

2.6. TOXICIDAD DEL LAS EN DIFERENTES AGUAS DE DILUCIÓN

2.6.1. Efectos umbrales

Tabla A IX.13. Biomasa neta ($Abs_t - Abs_{t=0}$) de cultivos de *Isochrysis galbana* expuestos a concentraciones de LAS en diferentes aguas de dilución. Ensayos CON suplemento de nutrientes.

| mg/L | t= 72 h | | | | | t= 96 h | | | | |
|------|---------|-------|-------|-------|-------|---------|-------|-------|-------|-------|
| | AM Est. | H | C | I | AI | AM Est. | H | C | I | AI |
| 0 | 0,392 | 0,324 | 0,306 | 0,187 | 0,229 | 0,492 | 0,438 | 0,421 | 0,281 | 0,325 |
| | 0,382 | 0,344 | 0,271 | 0,207 | 0,211 | 0,503 | 0,464 | 0,389 | 0,287 | 0,311 |
| | 0,384 | 0,326 | 0,305 | 0,215 | 0,213 | 0,504 | 0,452 | 0,439 | 0,312 | 0,324 |
| 2 | 0,402 | 0,342 | 0,260 | 0,249 | 0,233 | 0,493 | 0,468 | 0,373 | 0,358 | 0,343 |
| | 0,386 | 0,326 | 0,303 | 0,217 | 0,220 | 0,511 | 0,452 | 0,469 | 0,327 | 0,351 |
| | 0,382 | 0,350 | 0,293 | 0,210 | 0,247 | 0,523 | 0,490 | 0,429 | 0,290 | 0,387 |
| 4 | 0,358 | 0,317 | 0,285 | 0,228 | 0,232 | 0,460 | 0,429 | 0,390 | 0,342 | 0,339 |
| | 0,362 | 0,318 | 0,275 | 0,224 | 0,227 | 0,481 | 0,430 | 0,410 | 0,339 | 0,329 |
| | 0,347 | 0,327 | 0,264 | 0,205 | 0,234 | 0,474 | 0,447 | 0,377 | 0,310 | 0,356 |
| 6 | 0,354 | 0,319 | 0,259 | 0,202 | 0,231 | 0,461 | 0,432 | 0,366 | 0,292 | 0,347 |
| | 0,327 | 0,333 | 0,275 | 0,218 | 0,213 | 0,431 | 0,430 | 0,395 | 0,318 | 0,325 |
| | 0,292 | 0,324 | 0,274 | 0,206 | 0,227 | 0,414 | 0,456 | 0,388 | 0,310 | 0,351 |
| 8 | 0,315 | 0,300 | 0,239 | 0,188 | 0,174 | 0,416 | 0,567 | 0,343 | 0,264 | 0,279 |
| | 0,299 | 0,296 | 0,229 | 0,208 | 0,183 | 0,414 | 0,413 | 0,346 | 0,321 | 0,278 |
| | 0,288 | 0,285 | 0,236 | 0,176 | 0,206 | 0,395 | 0,401 | 0,357 | 0,257 | 0,311 |
| 10 | 0,249 | 0,254 | 0,186 | 0,130 | 0,143 | 0,352 | 0,383 | 0,267 | 0,224 | 0,240 |
| | 0,253 | 0,241 | 0,146 | 0,194 | 0,159 | 0,351 | 0,348 | 0,222 | 0,276 | 0,263 |
| | 0,232 | 0,255 | 0,150 | 0,189 | 0,168 | 0,330 | 0,382 | 0,253 | 0,275 | 0,263 |

Tabla A IX.14. Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *I. galbana* expuesta a diferentes concentraciones de LAS en diferentes medios de dilución.

| 72 horas | Agua Mar Estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras | | | | | |
|--|-------------------|---------------|----------------|---------|--------------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | |
| W calculado | 0,962 | 0,968 | 0,973 | 0,949 | 0,955 | | | | | |
| B calculado | 6,66 | 1,43 | 4,67 | 4,28 | 3,26 | | | | | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | |
| mg/L LAS | t _i | p | t _i | p | t _i | p | t _i | p | t _i | p |
| 2,0 | -0,31 | 0,2948 | -1,10 | 0,2235 | 0,65 | 0,3218 | -1,37 | 0,1005 | -1,65 | 0,0900 |
| 4,0 | 2,37 | 0,0025 | 1,47 | 0,1040 | 1,45 | 0,1056 | -0,98 | 0,1087 | -1,40 | 0,0464 |
| 6,0 | 4,82 | 0,0138 | 0,83 | 0,2360 | 1,85 | 0,0611 | -0,35 | 0,2936 | -0,63 | 0,2446 |
| 8,0 | 6,66 | 0,0003 | 5,20 | 0,0042 | 4,44 | 0,0038 | 0,76 | 0,1900 | 3,15 | 0,0270 |
| 10,0 | 11,04 | 0,0000 | 11,22 | 0,0002 | 9,98 | 0,0007 | 1,96 | 0,1112 | 6,41 | 0,0014 |
| MSD | 0,032 | | 0,018 | | 0,033 | | 0,041 | | 0,024 | |
| % reducción | 8,29 | | 5,47 | | 11,36 | | 20,06 | | 10,93 | |

| 96 horas | Agua Mar Estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras | | | | | |
|--|-------------------|---------------|----------------|---------|--------------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|
| Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza | | | | | | | | | | |
| W calculado | 0,958 | 0,947 | 0,972 | 0,977 | 0,930 | | | | | |
| B calculado | 2,95 | 1,18 | 5,98 | 2,67 | 2,10 | | | | | |
| Test de Dunnett | | | | | | | | | | |
| mg/L LAS | t _i | p | t _i | p | t _i | p | t _i | p | t _i | p |
| 2,0 | -0,79 | 0,1914 | -1,50 | 0,1171 | -0,35 | 0,4135 | -1,50 | 0,1102 | -3,10 | 0,0237 |
| 4,0 | 2,38 | 0,0092 | 1,29 | 0,0840 | 1,13 | 0,1210 | -1,75 | 0,0283 | -1,64 | 0,0393 |
| 6,0 | 5,48 | 0,0054 | 0,97 | 0,1728 | 1,57 | 0,0610 | -0,63 | 0,1682 | -1,62 | 0,0429 |
| 8,0 | 7,78 | 0,0001 | 3,09 | 0,0100 | 3,19 | 0,0057 | 0,60 | 0,3008 | 2,36 | 0,0296 |
| 10,0 | 13,22 | 0,0000 | 6,47 | 0,0021 | 7,96 | 0,0005 | 1,65 | 0,0745 | 4,97 | 0,0010 |
| MSD | 0,029 | | 0,031 | | 0,053 | | 0,053 | | 0,033 | |
| % reducción | 5,88 | | 6,87 | | 12,75 | | 18,05 | | 10,16 | |

W crítica (N=18 y $\alpha=0,05$)= 0,895; B crítica (V=No conc.-1, y $\alpha=0,05$)=11,07; T crítica (12 grados de libertad y 5 concentraciones)= 2,5
 * La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un $\alpha=0,05$ en la prueba de Dunnett (1-cola).

Tabla A IX.15.

Biomasa neta ($Abs_t - Abs_{t=0}$) de cultivos de *Isochrysis galbana* expuestos a concentraciones de LAS en diferentes aguas de dilución. Ensayos SIN suplemento de nutrientes.

| mg/L | t= 72 h | | | | | t= 96 h | | | | |
|------|---------|-------|--------|-------|--------|---------|-------|-------|-------|--------|
| | AM Est. | H | C | I | AI | AM Est. | H | C | I | AI |
| 0 | 0,107 | 0,096 | 0,067 | 0,127 | 0,023 | 0,114 | 0,101 | 0,063 | 0,165 | 0,033 |
| | 0,112 | 0,098 | 0,063 | 0,148 | 0,065 | 0,106 | 0,105 | 0,081 | 0,177 | 0,036 |
| | 0,099 | 0,088 | 0,050 | 0,106 | 0,031 | 0,110 | 0,106 | 0,063 | 0,151 | 0,039 |
| 2 | 0,097 | 0,090 | 0,051 | 0,112 | 0,023 | 0,115 | 0,084 | 0,063 | 0,147 | 0,011 |
| | 0,078 | 0,069 | 0,048 | 0,103 | 0,012 | 0,083 | 0,082 | 0,055 | 0,136 | 0,020 |
| | 0,088 | 0,081 | 0,058 | 0,103 | 0,047 | 0,108 | 0,068 | 0,072 | 0,152 | 0,033 |
| 4 | 0,103 | 0,074 | 0,049 | 0,143 | 0,017 | 0,110 | 0,077 | 0,065 | 0,179 | 0,025 |
| | 0,088 | 0,060 | 0,037 | 0,125 | 0,003 | 0,103 | 0,074 | 0,053 | 0,181 | 0,008 |
| | 0,080 | 0,072 | 0,050 | 0,206 | 0,008 | 0,098 | 0,075 | 0,061 | 0,264 | 0,017 |
| 6 | 0,083 | 0,062 | 0,037 | 0,096 | 0,001 | 0,090 | 0,069 | 0,053 | 0,134 | -0,020 |
| | 0,078 | 0,061 | 0,043 | 0,126 | 0,004 | 0,088 | 0,063 | 0,045 | 0,158 | 0,008 |
| | 0,066 | 0,059 | 0,050 | 0,111 | -0,006 | 0,073 | 0,064 | 0,064 | 0,176 | -0,003 |
| 8 | 0,060 | 0,039 | 0,016 | 0,108 | -0,019 | 0,061 | 0,046 | 0,023 | 0,137 | -0,016 |
| | 0,053 | 0,058 | 0,033 | 0,188 | -0,024 | 0,074 | 0,060 | 0,039 | 0,244 | -0,017 |
| | 0,026 | 0,027 | 0,043 | 0,092 | 0,001 | 0,053 | 0,040 | 0,050 | 0,138 | 0,001 |
| 10 | 0,032 | 0,022 | 0,022 | 0,080 | -0,050 | 0,027 | 0,016 | 0,021 | 0,097 | -0,057 |
| | 0,030 | 0,031 | 0,026 | 0,039 | -0,035 | 0,026 | 0,027 | 0,013 | 0,044 | -0,049 |
| | 0,043 | 0,008 | -0,003 | 0,103 | -0,027 | 0,028 | 0,010 | 0,010 | 0,150 | -0,037 |

Tabla A IX.16.

Valores de NOEC y LOEL experimentales obtenidos para *I. galbana* expuesta a diferentes concentraciones de LAS en diferentes medios de dilución.

| 72 horas | Agua Mar Estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras | | | | | |
|---|-------------------|---------------|----------------|---------|--------------------|--------|----------------|--------|----------------|--------|
| <i>Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza</i> | | | | | | | | | | |
| W calculado | 0,964 | 0,970 | 0,945 | 0,950 | 0,955 | | | | | |
| B calculado | 2,55 | 6,83 | 3,15 | 7,56 | 4,32 | | | | | |
| <i>Test de Dunnett</i> | | | | | | | | | | |
| mg/L LAS | t _i | p | t _i | p | t _i | p | t _i | p | t _i | p |
| 2,0 | 2,05 | 0,0257 | 1,75 | 0,0544 | 0,91 | 0,1327 | 0,80 | 0,0840 | 1,07 | 0,2483 |
| 4,0 | 1,75 | 0,0563 | 3,16 | 0,0045 | 1,75 | 0,0455 | -1,18 | 0,1605 | 2,62 | 0,0441 |
| 6,0 | 3,40 | 0,0043 | 4,16 | 0,0002 | 1,99 | 0,0294 | 0,61 | 0,1717 | 3,46 | 0,0194 |
| 8,0 | 6,68 | 0,0028 | 6,58 | 0,0026 | 3,50 | 0,0178 | -0,09 | 0,4727 | 4,64 | 0,0115 |
| 10,0 | 7,95 | 0,0001 | 9,20 | 0,0003 | 5,36 | 0,0062 | 2,02 | 0,0381 | 6,65 | 0,0030 |
| MSD | 0,022 | | 0,020 | | 0,021 | | 0,066 | | 0,029 | |
| % reducción | 21,06 | | 21,30 | | 34,95 | | 51,66 | | 72,95 | |
| 96 horas | Agua Mar Estándar | Ría de Huelva | Bahía de Cádiz | Río Iro | Bahía de Algeciras | | | | | |
| <i>Test de Normalidad y de homogeneidad de la varianza</i> | | | | | | | | | | |
| W calculado | 0,964 | 0,971 | 0,963 | 0,940 | 0,951 | | | | | |
| B calculado | 9,66 | 7,61 | 1,76 | 8,24 | 3,14 | | | | | |
| <i>Test de Dunnett</i> | | | | | | | | | | |
| mg/L LAS | t _i | p | t _i | p | t _i | p | t _i | p | t _i | p |
| 2,0 | 1,04 | 0,2339 | 4,70 | 0,0039 | 0,74 | 0,2527 | 0,59 | 0,0475 | 1,79 | 0,0455 |
| 4,0 | 0,82 | 0,1020 | 5,18 | 0,0000 | 1,22 | 0,1255 | -1,34 | 0,1033 | 2,36 | 0,0103 |
| 6,0 | 3,42 | 0,0054 | 6,99 | 0,0000 | 1,96 | 0,0697 | 0,25 | 0,2956 | 5,00 | 0,0040 |
| 8,0 | 6,14 | 0,0010 | 10,00 | 0,0004 | 4,14 | 0,0163 | -0,27 | 0,4115 | 5,69 | 0,0008 |
| 10,0 | 10,77 | 0,0000 | 15,61 | 0,0000 | 7,11 | 0,0007 | 2,06 | 0,0497 | 10,19 | 0,0001 |
| MSD | 0,019 | | 0,014 | | 0,019 | | 0,082 | | 0,021 | |
| % reducción | 17,52 | | 13,30 | | 27,68 | | 49,75 | | 57,00 | |
| <p><i>W crítica (N=18 y α=0,05)= 0,895; B crítica (V=No conc.-1, y α=0,05)=11,07; T crítica (12 grados de libertad y 5 concentraciones)= 2,5</i></p> <p><i>* La media para esta concentración (y superiores) es significativamente menor que la media del control a un α=0,05 en la prueba de Dunnett (1-cola).</i></p> | | | | | | | | | | |

2.6.2. Inhibición del crecimiento

Tabla A IX.17.
Valores de IC_p experimentales obtenidos para *I. galbana* expuesta a diferentes concentraciones de LAS en diferentes aguas de dilución CON adición de nutrientes

| | | Concentración de LAS estimada (mg/L) mediante el método ICp | | | | | | | |
|----------------------|--------|---|------------------------|----------------------|-------------|----------------------|-----------------------|-----------|---------|
| t (h) | % inh. | Int. Lineal | Lim. Conf. Expan. Inf. | Lim. Conf. Ori.. Inf | Valor medio | Lim. Conf. Ori.. Inf | Lim. Conf. Expan. Inf | Desv.Est. | |
| Agua de mar estándar | 5 | 3,2000 | 2,5588 | 2,8947 | 3,1965 | 3,5676 | 3,9719 | 0,1719 | |
| | | 8,3452 | 7,1623 | 7,7820 | 8,3117 | 8,6868 | 9,0625 | 0,2367 | |
| | 72 | 50 | (*) | | | | | | |
| | | 75 | (*) | | | | | | |
| | | 95 | (*) | | | | | | |
| | | 96 | 5 | 3,5439 | 2,6655 | 3,1256 | 3,5794 | 4,1953 | 4,9120 |
| | 96 | 25 | 8,9401 | 8,2799 | 8,6257 | 8,9403 | 9,2461 | 9,5826 | 0,1584 |
| | | 50 | (*) | | | | | | |
| 75 | | (*) | | | | | | | |
| 95 | | (*) | | | | | | | |
| Ría de Huelva | 5 | 6,3023 | 0,5693 | 3,5723 | 5,9207 | 6,8268 | 7,4037 | 1,0053 | |
| | | 9,9313 | | | | | | | |
| | 72 | 50 | (*) | | | | | | |
| | | 75 | (*) | | | | | | |
| | | 95 | (*) | | | | | | |
| | | 96 | 5 | 8,1991 | -1,6946 | 3,4878 | 7,1488 | 8,5889 | 9,0178 |
| | 96 | 25 | (*) | | | | | | |
| | | 50 | (*) | | | | | | |
| 75 | | (*) | | | | | | | |
| 95 | | (*) | | | | | | | |
| Bahía de Cádiz | 5 | 3,1313 | -1,4715 | 0,9395 | 3,1134 | 6,2698 | 9,7221 | 1,6068 | |
| | | 8,3829 | 7,7101 | 8,0625 | 8,3643 | 8,7399 | 9,1325 | 0,1823 | |
| | 72 | 50 | (*) | | | | | | |
| | | 75 | (*) | | | | | | |
| | | 95 | (*) | | | | | | |
| | | 96 | 5 | 3,5181 | -1,4558 | 1,1496 | 3,3388 | 6,2097 | 9,1704 |
| | 96 | 25 | 8,6645 | 7,8601 | 8,2814 | 8,6076 | 8,9799 | 9,3268 | 0,1828 |
| | | 50 | (*) | | | | | | |
| 75 | | (*) | | | | | | | |
| 95 | | (*) | | | | | | | |
| Río Iro | 5 | 6,4086 | 0,8863 | 3,7789 | 6,2943 | 8,1398 | 10,0441 | 0,9231 | |
| | | (*) | | | | | | | |
| | 72 | 50 | (*) | | | | | | |
| | | 75 | (*) | | | | | | |
| | | 95 | (*) | | | | | | |
| | | 96 | 5 | 6,4812 | 3,7644 | 5,1875 | 6,6230 | 8,5372 | 10,7987 |
| | 96 | 25 | (*) | | | | | | |
| | | 50 | (*) | | | | | | |
| 75 | | (*) | | | | | | | |
| 95 | | (*) | | | | | | | |
| Bahía de Algeciras | 5 | 6,4278 | 4,8124 | 5,6585 | 6,3929 | 6,8778 | 7,3728 | 0,2813 | |
| | | 9,1075 | (**) | (**) | 9,0652 | (**) | (**) | 0,3723 | |
| | 72 | 50 | (*) | | | | | | |
| | | 75 | (*) | | | | | | |
| | | 95 | (*) | | | | | | |
| | | 96 | 5 | 6,6636 | 5,3706 | 6,0479 | 6,5427 | 6,9313 | 7,2258 |
| | 96 | 25 | 9,9902 | | | | | | |
| | | 50 | (*) | | | | | | |
| 75 | | (*) | | | | | | | |
| 95 | | (*) | | | | | | | |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; DesvEst.: Desviación estándar

(*) No es posible realizar la interpolación lineal del conjunto de datos para este porcentaje de respuesta

(**) No es posible calcular límites de confianza

Tabla A IX.18.
Valores de IC_p experimentales obtenidos para *L. galbana* expuesta a diferentes concentraciones de LAS en diferentes aguas de dilución SIN adición de nutrientes

| | | Concentración de LAS estimada (mg/L) mediante el método IC _p | | | | | | | |
|----------------------|--------|---|------------------------|----------------------|-------------|----------------------|-----------------------|-----------|--------|
| t (h) | % inh. | Int. Lineal | Lim. Conf. Expan. Inf. | Lim. Conf. Ori.. Inf | Valor medio | Lim. Conf. Ori.. Inf | Lim. Conf. Expan. Inf | Desv.Est. | |
| Agua de mar estándar | 72 | 5 | 0,6235 | 0,2166 | 0,4297 | 0,7340 | 1,4227 | 2,3018 | 0,3350 |
| | | 25 | 5,4250 | 2,0216 | 3,8043 | 5,3264 | 6,2808 | 7,2222 | 0,7151 |
| | | 50 | 7,5455 | 6,2660 | 6,9362 | 7,6732 | 8,6545 | 9,8745 | 0,5091 |
| | | 75 | (*) | | | | | | |
| | | 95 | (*) | | | | | | |
| | 96 | 5 | 1,5349 | -0,2768 | 0,6722 | 2,2176 | 4,2881 | 7,3166 | 1,2960 |
| | | 25 | 6,1111 | 4,4397 | 5,3152 | 6,0731 | 6,7143 | 7,3778 | 0,3803 |
| | | 50 | 8,4299 | 7,3031 | 7,8933 | 8,3921 | 8,7813 | 9,1677 | 0,2279 |
| | | 75 | 9,9720 | | | | | | |
| | | 95 | (*) | | | | | | |
| Ría de Huelva | 72 | 5 | 1,5349 | -0,2768 | 0,6722 | 2,2142 | 4,2883 | 7,3170 | 1,2806 |
| | | 25 | 6,1111 | 4,5468 | 5,3662 | 6,0557 | 6,6951 | 7,3375 | 0,3709 |
| | | 50 | 8,4299 | 7,3089 | 7,8961 | 8,4103 | 8,8077 | 9,2233 | 0,2345 |
| | | 75 | 9,9720 | | | | | | 0,0273 |
| | | 95 | (*) | | | | | | |
| | 96 | 5 | 0,4000 | 0,2571 | 0,3319 | 0,4175 | 0,5386 | 0,6911 | 0,0613 |
| | | 25 | 2,0000 | 1,2374 | 1,6368 | 2,5001 | 3,8261 | 5,8348 | 0,7223 |
| | | 50 | 7,6000 | 6,4313 | 7,0435 | 7,6297 | 8,3200 | 9,1120 | 0,3789 |
| | | 75 | 9,4624 | (**) | (**) | 9,4647 | (**) | (**) | 0,1954 |
| | | 95 | (*) | | | | | | |
| Bahía de Cádiz | 72 | 5 | 0,7826 | -0,0332 | 0,3941 | 1,0670 | 2,9706 | 5,3774 | 0,7666 |
| | | 25 | 4,3333 | -0,6297 | -0,6297 | 4,6210 | 10,2207 | 10,2207 | 1,4805 |
| | | 50 | 8,0851 | (**) | (**) | 8,0585 | (**) | (**) | 0,6867 |
| | | 75 | (*) | | | | | | |
| | | 95 | (*) | | | | | | |
| | 96 | 5 | 1,2176 | -0,3766 | 0,4585 | 1,8851 | 4,7444 | 8,6239 | 1,3574 |
| | | 25 | 6,2700 | 0,2780 | 3,4167 | 5,9847 | 7,7609 | 9,4008 | 1,0583 |
| | | 50 | 8,2500 | 5,7669 | 7,0676 | 8,1563 | 8,9490 | 9,7179 | 0,5198 |
| | | 75 | 9,7721 | (**) | (**) | 9,6713 | (**) | (**) | 0,2135 |
| | | 95 | | | | | | | |
| Río Iro | 72 | 5 | 5,2820 | -4,3716 | 0,6850 | 5,2641 | 8,3729 | 11,7729 | 2,4192 |
| | | 25 | 8,9711 | (**) | (**) | 8,6051 | (**) | (**) | 0,8460 |
| | | 50 | (*) | | | | | | |
| | | 75 | (*) | | | | | | |
| | | 95 | (*) | | | | | | |
| | 96 | 5 | 8,0201 | -4,8588 | 1,8873 | 6,5408 | 8,4532 | 8,9296 | 1,7852 |
| | | 25 | 9,0420 | (**) | (**) | 8,8333 | (**) | (**) | 0,5120 |
| | | 50 | (*) | | | | | | |
| | | 75 | (*) | | | | | | |
| | | 95 | (*) | | | | | | |
| Bahía de Algeciras | 72 | 5 | 0,3216 | -0,0549 | 0,1423 | 0,7845 | 2,1667 | 4,1962 | 0,8033 |
| | | 25 | 1,6081 | -0,2860 | 0,7061 | 1,6831 | 2,8925 | 4,3054 | 0,7684 |
| | | 50 | 2,8333 | -0,1276 | 1,4234 | 2,6900 | 3,9118 | 5,0980 | 0,7394 |
| | | 75 | 3,9352 | 0,9849 | 2,5303 | 3,9588 | 5,1346 | 6,4540 | 0,6213 |
| | | 95 | 5,5750 | 3,8775 | 4,7667 | 5,7667 | 7,0556 | 8,6842 | 0,5547 |
| | 96 | 5 | 0,2455 | 0,0678 | 0,1609 | 0,3033 | 0,7600 | 1,3260 | 0,2102 |
| | | 25 | 1,2273 | 0,3125 | 0,7917 | 1,3918 | 2,7632 | 4,4526 | 0,5556 |
| | | 50 | 3,4286 | -0,3932 | 1,6087 | 3,2014 | 4,4593 | 5,5930 | 0,9739 |
| | | 75 | 4,9200 | 2,7340 | 3,8790 | 4,8870 | 5,7429 | 6,6480 | 0,3701 |
| | | 95 | 5,7840 | 5,3189 | 5,5625 | 5,9725 | 7,5375 | 9,4664 | 0,5194 |

Int. Lineal: Interpolación lineal estimada; Lim.Conf.: Límite de confianza; Inf.: Inferior; Sup.: Superior; DesvEst.: Desviación estándar

(*) No es posible realizar la interpolación lineal del conjunto de datos para este porcentaje de respuesta

(**) No es posible calcular límites de confianza

ANEXO X. ENSAYOS DE AGUAS RECEPTORAS

1. RESUMEN DEL ENSAYO

CONDICIONES DE ENSAYO

- Tipo de ensayo: estático sin renovación
- Volumen de los viales de ensayo: 15 mL
- Volumen de solución de ensayo: 4 mL
- Agua de dilución: ver tabla
- Medio nutriente adicional: ver tabla
- Temperatura de ensayo: $20 \pm 0,1$ °C
- Iluminación: constante, 11000 lux
- Aireación: diaria -de forma manual-
- Duración del ensayo: 10 días (240 h)
- Medidas de biomasa: turbidez, a $\lambda = 690$ nm

MICROALGAS ENSAYADAS

- *Nannochloropsis gaditana*
- *Isochrysis galbana*
- *Thalassiosira pseudonana*
- *Tetraselmis chuii*

RESULTADOS OBTENIDOS

- Valores de biomasa (Abs, 690 nm) de cada tratamiento
- Valores de porcentaje de inhibición/estimulación del crecimiento:

$$\% I, S = \frac{(\text{Abs}(\text{Tratamiento}_t) - \text{Abs}(\text{Tratamiento}_{t=0})) - (\text{Abs}(\text{Control}_t) - \text{Abs}(\text{Control}_{t=0}))}{\text{Abs}(\text{Control}_t) - \text{Abs}(\text{Control}_{t=0})} \cdot 100$$

Donde I es la inhibición, S es la estimulación del crecimiento o sobrecrecimiento, $t=0$ es el tiempo inicial, y t es el tiempo de exposición.

- Valores del índice de eutrofización I_E :

$$I_E = \frac{\text{Abs}'_{\text{ensayo sin aporte adicional de nutrientes}}}{\text{Abs}'_{\text{ensayo con aporte adicional de nutrientes}}}$$

Donde Abs' es la biomasa normalizada.

$$\text{Abs}' = \text{Abs}(t) - \text{Abs}(t=0)$$

NIVELES DE NUTRIENTES DE LAS AGUAS RECEPTORAS

| Estación | N-NO ₂ (mg/L) | N-NO ₃ (mg/L) | NH ₄ (mg/L) | N (mg/L) | P-PO ₄ (mg/L) | CT (mg/L) | Cl (mg/L) | COT (mg/L) |
|----------|--------------------------|--------------------------|------------------------|----------|--------------------------|-----------|-----------|------------|
| H1A | 0,013 | 0,121 | 0,048 | 0,181 | 0,087 | 27,05 | 22,53 | 4,52 |
| H1B | 0,013 | 0,161 | 0,059 | 0,233 | 0,085 | 27,01 | 23,08 | 3,93 |
| H1C | 0,013 | 0,209 | 0,044 | 0,266 | 0,089 | 26,31 | 22,63 | 3,68 |
| H2A | 0,009 | 0,127 | 0,106 | 0,242 | 0,057 | 27,26 | 24,09 | 3,17 |
| H2B | 0,007 | 0,138 | 0,031 | 0,176 | 0,056 | 27,49 | 23,97 | 3,52 |
| H2C | 0,007 | 0,106 | 0,036 | 0,149 | 0,053 | 27,66 | 23,90 | 3,76 |
| H3A | 0,003 | 0,049 | 0,022 | 0,074 | 0,026 | 27,62 | 24,79 | 2,83 |
| H3C | 0,003 | 0,057 | 0,027 | 0,088 | 0,030 | 28,01 | 24,38 | 3,63 |
| H4A | 0,004 | 0,165 | 0,025 | 0,194 | 0,018 | 31,04 | 25,78 | 5,26 |
| H4B | 0,003 | 0,262 | 0,027 | 0,293 | 0,019 | 29,32 | 25,79 | 3,53 |
| H4C | 0,003 | 0,208 | 0,024 | 0,235 | 0,024 | 29,50 | 25,18 | 4,32 |
| H5A | 0,009 | 0,160 | 0,075 | 0,243 | 0,064 | 27,48 | 23,76 | 3,72 |
| H5B | 0,003 | 0,061 | 0,022 | 0,086 | 0,027 | 28,32 | 24,35 | 3,97 |
| H5C | 0,004 | 0,135 | 0,027 | 0,166 | 0,028 | 30,71 | 25,61 | 5,10 |
| H5D | 0,003 | 0,103 | 0,028 | 0,134 | 0,015 | 29,23 | 25,58 | 3,65 |
| H5E | 0,018 | 0,155 | 0,126 | 0,299 | 0,086 | 25,94 | 21,17 | 4,77 |
| H5F | 0,008 | 0,155 | 0,032 | 0,195 | 0,092 | 27,57 | 22,05 | 5,52 |

| Estación | N-NO ₂ (mg/L) | N-NO ₃ (mg/L) | NH ₄ (mg/L) | N (mg/L) | P-PO ₄ (mg/L) | CT (mg/L) | Cl (mg/L) | COT (mg/L) |
|----------|--------------------------|--------------------------|------------------------|----------|--------------------------|-----------|-----------|------------|
| C1A | 0,004 | 0,090 | 0,018 | 0,112 | 0,011 | 29,790 | 25,940 | 3,850 |
| C1B | 0,004 | 0,049 | 0,017 | 0,069 | 0,012 | 30,230 | 26,520 | 3,710 |
| C1C | 0,004 | 0,039 | 0,017 | 0,059 | 0,012 | 29,540 | 25,920 | 3,620 |
| C1D | 0,004 | 0,139 | 0,063 | 0,207 | 0,014 | 31,660 | 27,310 | 4,350 |
| C2A | 0,004 | 0,051 | 0,019 | 0,074 | 0,012 | 30,950 | 27,050 | 3,900 |
| C2B | 0,005 | 0,083 | 0,021 | 0,109 | 0,010 | 32,120 | 27,540 | 4,580 |
| C2C | 0,005 | 0,121 | 0,023 | 0,149 | 0,012 | 31,060 | 26,590 | 4,470 |
| C3A | 0,025 | 0,067 | 0,024 | 0,116 | 0,013 | 31,000 | 26,900 | 4,100 |
| C3B | 0,004 | 0,050 | 0,014 | 0,069 | 0,012 | 30,910 | 26,760 | 4,150 |
| C3C | 0,004 | 0,072 | 0,031 | 0,107 | 0,016 | 31,250 | 27,360 | 3,890 |
| C4A | 0,004 | 0,054 | 0,025 | 0,084 | 0,016 | 32,960 | 28,460 | 4,500 |
| C4B | 0,079 | 0,053 | 0,026 | 0,158 | 0,017 | 32,590 | 28,120 | 4,470 |
| C5A | 0,004 | 0,716 | 0,328 | 1,047 | 0,026 | 33,770 | 29,290 | 4,480 |
| C5E | 0,010 | 0,336 | 0,069 | 0,415 | 0,020 | 33,790 | 28,940 | 4,850 |
| C5F | 0,019 | 0,021 | 0,125 | 0,165 | 0,062 | 35,320 | 30,200 | 5,120 |

| Estación | N-NO ₂ (mg/L) | N-NO ₃ (mg/L) | NH ₄ (mg/L) | N (mg/L) | P-PO ₄ (mg/L) | CT (mg/L) | Cl (mg/L) | COT (mg/L) |
|----------|--------------------------|--------------------------|------------------------|----------|--------------------------|-----------|-----------|------------|
| I2 | 0,194 | 5,373 | 1,493 | 2,353 | 0,317 | 43,730 | 33,830 | 9,900 |
| I3 | 0,124 | 3,799 | 8,399 | 4,107 | 1,711 | 47,730 | 40,090 | 7,640 |
| I4 | 0,143 | 3,610 | 3,387 | 2,380 | 0,675 | 45,840 | 35,040 | 10,800 |
| I5 | 0,104 | 2,686 | 2,528 | 1,773 | 0,497 | 38,530 | 32,640 | 5,890 |
| I6 | 0,083 | 2,307 | 0,623 | 1,004 | 0,147 | 38,920 | 33,370 | 5,550 |
| I7 | 0,135 | 6,010 | 0,908 | 2,351 | 0,191 | 32,160 | 26,930 | 5,230 |
| I8 | 0,008 | 0,072 | 0,000 | 0,027 | 0,025 | 29,410 | 25,000 | 4,410 |

| Estación | N-NO ₂ (mg/L) | N-NO ₃ (mg/L) | NH ₄ (mg/L) | N (mg/L) | P-PO ₄ (mg/L) | CT (mg/L) | Cl (mg/L) | COT (mg/L) |
|----------|--------------------------|--------------------------|------------------------|----------|--------------------------|-----------|-----------|------------|
| AI 1A | 0,019 | 0,277 | 0,005 | 0,100 | 0,015 | 31,170 | 30,800 | 0,370 |
| AI 1B | 0,017 | 0,190 | 0,009 | 0,072 | 0,015 | 29,430 | 28,660 | 0,770 |
| AI 1E | 0,007 | 0,076 | 0,772 | 0,855 | 0,302 | 34,760 | 32,330 | 2,890 |
| AI 2A | 0,354 | 2,565 | 0,027 | 0,982 | 0,019 | 29,620 | 29,350 | 0,270 |
| AI 2B | 0,007 | 0,043 | 0,000 | 0,016 | 0,017 | 29,320 | 28,140 | 1,180 |
| AI 2C | 0,026 | 0,040 | 0,000 | 0,022 | 0,017 | 29,510 | 29,200 | 0,310 |
| AI 3A | 0,013 | 0,164 | 0,001 | 0,059 | 0,016 | 29,280 | 28,680 | 0,600 |

2. RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ENSAYOS DE MEDIO RECEPTOR

2.1. RÍA DE HUELVA

2.1.1. *Nannochloropsis gaditana*

Tabla A X.1.

Evolución de la biomasa de *Nannochloropsis gaditana*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| | | <u><i>N. gaditana</i></u> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | |
|---------|--|---|-------|-------|-------|--|-------|-------|-------|
| | | Ensayo <u>CON</u> adición de medio nutriente f/2 | | | | Ensayo <u>SIN</u> adición de medio nutriente f/2 | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| Control | | 0,328 | 0,392 | 0,496 | 0,726 | 1,007 | 1,380 | 1,564 | 1,793 |
| | | 0,334 | 0,386 | 0,470 | 0,657 | 0,894 | 1,278 | 1,555 | 1,728 |
| | | 0,327 | 0,380 | 0,441 | 0,589 | 0,861 | 1,182 | 1,501 | 1,683 |
| | | 0,333 | 0,368 | 0,433 | 0,543 | 0,849 | 1,232 | 1,473 | 1,592 |
| H1A | | 0,332 | 0,374 | 0,453 | 0,553 | 0,819 | 1,120 | 1,401 | 1,594 |
| | | 0,336 | 0,368 | 0,453 | 0,534 | 0,788 | 1,107 | 1,335 | 1,494 |
| H1B | | 0,345 | 0,385 | 0,464 | 0,573 | 0,870 | 1,152 | 1,419 | 1,554 |
| | | 0,343 | 0,378 | 0,456 | 0,550 | 0,822 | 1,140 | 1,367 | 1,535 |
| H1C | | 0,323 | 0,371 | 0,448 | 0,542 | 0,785 | 1,103 | 1,390 | 1,579 |
| | | 0,332 | 0,362 | 0,446 | 0,542 | 0,823 | 1,124 | 1,359 | 1,478 |
| H2A | | 0,335 | 0,372 | 0,464 | 0,568 | 0,868 | 1,143 | 1,387 | 1,539 |
| | | 0,344 | 0,383 | 0,470 | 0,557 | 0,836 | 1,133 | 1,399 | 1,548 |
| H2B | | 0,333 | 0,376 | 0,461 | 0,558 | 0,851 | 1,120 | 1,367 | 1,502 |
| | | 0,347 | 0,389 | 0,470 | 0,560 | 0,819 | 1,140 | 1,382 | 1,521 |
| H2C | | 0,341 | 0,380 | 0,463 | 0,545 | 0,778 | 1,062 | 1,410 | 1,607 |
| | | 0,325 | 0,368 | 0,453 | 0,538 | 0,748 | 1,077 | 1,437 | 1,616 |
| H3A | | 0,374 | 0,373 | 0,469 | 0,572 | 0,811 | 1,129 | 1,464 | 1,624 |
| | | 0,334 | 0,371 | 0,460 | 0,547 | 0,803 | 1,125 | 1,438 | 1,614 |
| H3C | | 0,372 | 0,382 | 0,472 | 0,601 | 0,889 | 1,137 | 1,446 | 1,649 |
| | | 0,345 | 0,365 | 0,449 | 0,550 | 0,832 | 1,164 | 1,408 | 1,574 |
| H4A | | 0,325 | 0,368 | 0,480 | 0,592 | 0,830 | 1,175 | 1,482 | 1,655 |
| | | 0,337 | 0,376 | 0,466 | 0,553 | 0,808 | 1,167 | 1,404 | 1,642 |
| H4B | | 0,336 | 0,384 | 0,482 | 0,593 | 0,854 | 1,164 | 1,489 | 1,675 |
| | | 0,335 | 0,391 | 0,478 | 0,588 | 0,854 | 1,180 | 1,463 | 1,649 |
| H4C | | 0,325 | 0,379 | 0,464 | 0,598 | 0,840 | 1,150 | 1,462 | 1,648 |
| | | 0,324 | 0,373 | 0,452 | 0,526 | 0,811 | 1,141 | 1,431 | 1,627 |
| H5A | | 0,348 | 0,404 | 0,506 | 0,622 | 0,831 | 1,092 | 1,414 | 1,633 |
| | | 0,383 | 0,425 | 0,506 | 0,614 | 0,867 | 1,189 | 1,525 | 1,733 |
| H5B | | 0,334 | 0,382 | 0,458 | 0,569 | 0,799 | 1,162 | 1,418 | 1,609 |
| | | 0,331 | 0,374 | 0,448 | 0,548 | 0,810 | 1,159 | 1,404 | 1,517 |
| H5C | | 0,351 | 0,397 | 0,488 | 0,588 | 0,863 | 1,212 | 1,523 | 1,733 |
| | | 0,338 | 0,385 | 0,469 | 0,563 | 0,837 | 1,162 | 1,429 | 1,592 |
| H5D | | 0,333 | 0,375 | 0,458 | 0,545 | 0,837 | 1,133 | 1,352 | 1,551 |
| | | 0,322 | 0,359 | 0,441 | 0,523 | 0,785 | 1,098 | 1,361 | 1,557 |
| H5E | | 0,331 | 0,368 | 0,435 | 0,559 | 0,857 | 1,195 | 1,415 | 1,494 |
| | | 0,340 | 0,378 | 0,455 | 0,571 | 0,861 | 1,168 | 1,456 | 1,646 |
| H5F | | 0,332 | 0,398 | 0,503 | 0,607 | 0,848 | 1,187 | 1,516 | 1,692 |
| | | 0,335 | 0,379 | 0,448 | 0,544 | 0,808 | 1,180 | 1,337 | 1,469 |
| | | 0,306 | 0,390 | 0,475 | 0,550 | 0,600 | 0,622 | 0,689 | 0,746 |
| | | 0,312 | 0,395 | 0,463 | 0,500 | 0,534 | 0,571 | 0,648 | 0,728 |
| | | 0,305 | 0,380 | 0,435 | 0,465 | 0,510 | 0,523 | 0,601 | 0,710 |
| | | 0,311 | 0,360 | 0,427 | 0,436 | 0,499 | 0,556 | 0,603 | 0,675 |
| | | 0,333 | 0,409 | 0,512 | 0,546 | 0,602 | 0,692 | 0,779 | 0,852 |
| | | 0,343 | 0,402 | 0,499 | 0,538 | 0,597 | 0,688 | 0,771 | 0,836 |
| | | 0,348 | 0,425 | 0,526 | 0,559 | 0,624 | 0,726 | 0,825 | 0,873 |
| | | 0,351 | 0,418 | 0,516 | 0,558 | 0,615 | 0,717 | 0,801 | 0,858 |
| | | 0,406 | 0,430 | 0,534 | 0,576 | 0,654 | 0,764 | 0,866 | 0,935 |
| | | 0,335 | 0,413 | 0,516 | 0,560 | 0,630 | 0,741 | 0,837 | 0,908 |
| | | 0,346 | 0,420 | 0,512 | 0,553 | 0,614 | 0,713 | 0,807 | 0,868 |
| | | 0,354 | 0,429 | 0,531 | 0,567 | 0,627 | 0,736 | 0,828 | 0,909 |
| | | 0,335 | 0,410 | 0,510 | 0,546 | 0,607 | 0,700 | 0,794 | 0,851 |
| | | 0,335 | 0,405 | 0,507 | 0,546 | 0,615 | 0,700 | 0,804 | 0,849 |
| | | 0,331 | 0,402 | 0,496 | 0,530 | 0,580 | 0,656 | 0,740 | 0,807 |
| | | 0,320 | 0,387 | 0,479 | 0,524 | 0,577 | 0,651 | 0,735 | 0,791 |
| | | 0,336 | 0,411 | 0,510 | 0,545 | 0,606 | 0,712 | 0,798 | 0,852 |
| | | 0,330 | 0,404 | 0,498 | 0,535 | 0,596 | 0,696 | 0,794 | 0,836 |
| | | 0,326 | 0,413 | 0,519 | 0,538 | 0,602 | 0,703 | 0,789 | 0,846 |
| | | 0,326 | 0,411 | 0,507 | 0,549 | 0,597 | 0,685 | 0,766 | 0,826 |
| | | 0,337 | 0,425 | 0,524 | 0,559 | 0,628 | 0,737 | 0,828 | 0,890 |
| | | 0,326 | 0,413 | 0,509 | 0,544 | 0,605 | 0,703 | 0,791 | 0,843 |
| | | 0,336 | 0,424 | 0,527 | 0,553 | 0,620 | 0,721 | 0,812 | 0,875 |
| | | 0,352 | 0,422 | 0,509 | 0,551 | 0,619 | 0,720 | 0,822 | 0,871 |
| | | 0,324 | 0,404 | 0,485 | 0,535 | 0,592 | 0,700 | 0,784 | 0,876 |
| | | 0,320 | 0,397 | 0,489 | 0,522 | 0,675 | 0,682 | 0,772 | 0,839 |
| | | 0,346 | 0,436 | 0,538 | 0,564 | 0,634 | 0,744 | 0,833 | 0,899 |
| | | 0,325 | 0,412 | 0,509 | 0,551 | 0,606 | 0,704 | 0,787 | 0,855 |
| | | 0,338 | 0,426 | 0,525 | 0,559 | 0,632 | 0,729 | 0,818 | 0,893 |
| | | 0,368 | 0,415 | 0,503 | 0,539 | 0,605 | 0,694 | 0,795 | 0,861 |
| | | 0,330 | 0,414 | 0,510 | 0,543 | 0,610 | 0,716 | 0,808 | 0,878 |
| | | 0,350 | 0,439 | 0,529 | 0,575 | 0,623 | 0,709 | 0,794 | 0,847 |
| | | 0,334 | 0,416 | 0,511 | 0,550 | 0,610 | 0,715 | 0,805 | 0,865 |
| | | 0,313 | 0,395 | 0,493 | 0,529 | 0,596 | 0,700 | 0,806 | 0,852 |
| | | 0,356 | 0,430 | 0,532 | 0,576 | 0,658 | 0,773 | 0,866 | 0,925 |
| | | 0,349 | 0,417 | 0,519 | 0,555 | 0,628 | 0,738 | 0,831 | 0,895 |
| | | 0,339 | 0,403 | 0,520 | 0,568 | 0,645 | 0,761 | 0,866 | 0,908 |
| | | 0,337 | 0,408 | 0,518 | 0,572 | 0,675 | 0,832 | 0,966 | 1,075 |

Tabla A X.2. Porcentajes de inhibición. Ensayo **CON** adición de medio nutriente (*N. gaditana*-Ría de Huelva)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| H1A | -27,45 | -8,46 | -29,53 | -17,83 | -16,84 | -13,33 | -11,61 |
| H1B | -25,49 | -10,77 | -26,85 | -12,24 | -14,50 | -12,07 | -12,27 |
| H1C | -23,53 | -7,69 | -27,85 | -16,61 | -16,20 | -12,24 | -12,27 |
| H2A | -25,49 | -1,54 | -25,17 | -10,31 | -14,82 | -11,65 | -12,05 |
| H2B | -15,69 | -3,08 | -26,51 | -13,46 | -15,78 | -13,24 | -14,39 |
| H2C | -19,61 | -3,85 | -29,87 | -24,83 | -21,43 | -8,55 | -6,57 |
| H3A | -64,71 | -14,62 | -30,87 | -20,80 | -17,59 | -8,05 | -7,60 |
| H3C | -70,59 | -21,54 | -27,18 | -12,24 | -15,57 | -10,39 | -8,47 |
| H4A | -19,61 | 9,23 | -18,79 | -14,69 | -10,45 | -6,79 | -3,73 |
| H4B | 1,96 | 11,54 | -14,43 | -9,27 | -10,77 | -4,36 | -3,07 |
| H4C | 1,96 | 3,08 | -20,13 | -12,41 | -12,47 | -5,95 | -4,09 |
| H5A | -3,92 | 8,46 | -15,10 | -15,38 | -17,38 | -7,46 | -3,73 |
| H5B | -9,80 | -6,92 | -24,16 | -17,48 | -11,73 | -9,56 | -10,08 |
| H5C | -7,84 | 3,08 | -22,48 | -11,54 | -10,13 | -5,11 | -3,73 |
| H5D | -21,57 | -6,15 | -30,54 | -15,38 | -15,99 | -13,75 | -10,37 |
| H5E | -25,49 | -15,38 | -22,82 | -8,39 | -9,81 | -7,80 | -9,79 |
| H5F | 7,84 | 9,23 | -18,79 | -13,46 | -9,38 | -8,38 | -8,91 |

Tabla A X.3. Porcentajes de inhibición. Ensayo **SIN** adición de medio nutriente (*N. gaditana*-Ría de Huelva)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| H1A | -6,85 | 18,31 | 13,97 | 15,42 | 35,38 | 33,64 | 24,63 |
| H1B | -1,37 | 21,13 | 16,76 | 18,94 | 43,08 | 41,90 | 27,09 |
| H1C | -30,14 | 9,15 | 10,61 | 19,82 | 46,92 | 47,09 | 35,71 |
| H2A | 2,74 | 21,13 | 17,32 | 19,38 | 44,23 | 43,12 | 32,76 |
| H2B | 0,00 | 22,54 | 17,88 | 21,59 | 40,38 | 41,90 | 26,85 |
| H2C | -5,48 | 14,08 | 12,85 | 11,45 | 26,15 | 25,99 | 16,75 |
| H3A | 2,74 | 20,42 | 15,64 | 18,06 | 42,69 | 41,59 | 25,86 |
| H3C | 17,81 | 31,69 | 21,79 | 20,70 | 41,54 | 38,23 | 25,62 |
| H4A | 20,55 | 30,28 | 22,91 | 25,55 | 49,62 | 46,18 | 31,77 |
| H4B | 8,22 | 22,54 | 16,20 | 21,59 | 45,00 | 44,65 | 30,30 |
| H4C | 8,22 | 16,20 | 15,64 | 37,44 | 41,92 | 39,45 | 32,02 |
| H5A | 21,92 | 32,39 | 24,02 | 25,55 | 49,62 | 45,26 | 33,50 |
| H5B | -6,85 | 13,38 | 9,50 | 17,18 | 38,08 | 38,84 | 29,06 |
| H5C | 19,18 | 26,76 | 22,35 | 22,03 | 43,46 | 40,98 | 28,82 |
| H5D | 12,33 | 26,06 | 20,67 | 23,35 | 47,69 | 47,40 | 31,77 |
| H5E | -2,74 | 21,83 | 18,99 | 28,19 | 55,00 | 51,68 | 37,44 |
| H5F | -6,85 | 27,46 | 29,61 | 41,85 | 76,54 | 76,76 | 61,08 |

Tabla A X.4. Índice de eutrofización $-I_E-$ (*N. gaditana*-Ría de Huelva)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| H1A | 1,431 | 1,092 | 0,601 | 0,397 | 0,277 | 0,274 | 0,297 |
| H1B | 1,838 | 1,412 | 0,971 | 0,557 | 0,451 | 0,423 | 0,418 |
| H1C | 1,895 | 1,483 | 0,959 | 0,538 | 0,464 | 0,442 | 0,430 |
| H2A | 1,308 | 1,292 | 0,921 | 0,570 | 0,486 | 0,459 | 0,459 |
| H2B | 1,974 | 1,344 | 0,942 | 0,528 | 0,469 | 0,444 | 0,448 |
| H2C | 1,698 | 1,381 | 0,963 | 0,558 | 0,462 | 0,448 | 0,439 |
| H3A | 1,683 | 1,296 | 0,967 | 0,588 | 0,445 | 0,378 | 0,371 |
| H3C | 4,167 | 1,541 | 1,005 | 0,592 | 0,480 | 0,422 | 0,404 |
| H4A | 5,733 | 1,833 | 1,005 | 0,546 | 0,465 | 0,423 | 0,407 |
| H4B | 2,146 | 1,303 | 0,909 | 0,584 | 0,463 | 0,430 | 0,406 |
| H4C | 1,519 | 1,200 | 0,816 | 0,532 | 0,450 | 0,415 | 0,399 |
| H5A | 1,519 | 1,231 | 0,870 | 0,623 | 0,449 | 0,406 | 0,408 |
| H5B | 1,816 | 1,333 | 0,877 | 0,589 | 0,502 | 0,430 | 0,411 |
| H5C | 1,478 | 1,331 | 0,867 | 0,564 | 0,434 | 0,421 | 0,426 |
| H5D | 1,851 | 1,343 | 0,948 | 0,547 | 0,442 | 0,407 | 0,397 |
| H5E | 2,050 | 1,467 | 1,043 | 0,579 | 0,487 | 0,468 | 0,436 |
| H5F | 1,868 | 1,573 | 0,926 | 0,555 | 0,476 | 0,451 | 0,452 |

2.1.2. *Isochrysis galbana*

Tabla A X.5.

Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| | | <i>I. galbana</i>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | |
|----------------|--|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | | Ensayo CON adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| Control | | 0,209 | 0,214 | 0,252 | 0,328 | 0,423 | 0,604 | 0,758 | 0,850 | |
| | | 0,195 | 0,212 | 0,246 | 0,308 | 0,421 | 0,621 | 0,802 | 0,906 | |
| | | 0,210 | 0,225 | 0,241 | 0,330 | 0,459 | 0,659 | 0,831 | 0,897 | |
| | | 0,245 | 0,228 | 0,254 | 0,329 | 0,423 | 0,622 | 0,817 | 0,960 | |
| H1A | | 0,248 | 0,243 | 0,244 | 0,297 | 0,395 | 0,625 | 0,915 | 1,079 | |
| | | 0,219 | 0,218 | 0,234 | 0,280 | 0,389 | 0,611 | 0,867 | 0,971 | |
| H1B | | 0,267 | 0,236 | 0,244 | 0,289 | 0,400 | 0,632 | 0,841 | 0,942 | |
| | | 0,240 | 0,221 | 0,238 | 0,280 | 0,375 | 0,594 | 0,779 | 0,922 | |
| H1C | | 0,220 | 0,218 | 0,237 | 0,307 | 0,430 | 0,655 | 0,866 | 0,946 | |
| | | 0,229 | 0,236 | 0,263 | 0,339 | 0,462 | 0,711 | 0,958 | 1,090 | |
| H2A | | 0,249 | 0,256 | 0,282 | 0,344 | 0,448 | 0,662 | 0,933 | 1,126 | |
| | | 0,237 | 0,228 | 0,246 | 0,287 | 0,403 | 0,617 | 0,857 | 1,019 | |
| H2B | | 0,243 | 0,251 | 0,286 | 0,337 | 0,433 | 0,643 | 0,858 | 1,015 | |
| | | 0,222 | 0,219 | 0,250 | 0,304 | 0,409 | 0,622 | 0,849 | 0,954 | |
| H2C | | 0,243 | 0,239 | 0,243 | 0,289 | 0,391 | 0,541 | 0,793 | 0,932 | |
| | | 0,234 | 0,225 | 0,244 | 0,277 | 0,360 | 0,545 | 0,730 | 0,887 | |
| H3A | | 0,216 | 0,224 | 0,262 | 0,328 | 0,429 | 0,628 | 0,836 | 0,940 | |
| | | 0,229 | 0,230 | 0,263 | 0,311 | 0,400 | 0,617 | 0,860 | 1,051 | |
| H3C | | 0,236 | 0,241 | 0,282 | 0,354 | 0,467 | 0,667 | 0,854 | 0,970 | |
| | | 0,235 | 0,245 | 0,270 | 0,328 | 0,327 | 0,666 | 0,898 | 1,047 | |
| H4A | | 0,261 | 0,247 | 0,280 | 0,357 | 0,456 | 0,648 | 0,829 | 1,024 | |
| | | 0,232 | 0,246 | 0,281 | 0,336 | 0,353 | 0,660 | 0,913 | 1,085 | |
| H4B | | 0,256 | 0,224 | 0,267 | 0,353 | 0,481 | 0,690 | 0,905 | 1,104 | |
| | | 0,215 | 0,230 | 0,279 | 0,350 | 0,371 | 0,726 | 0,963 | 0,974 | |
| H4C | | 0,220 | 0,219 | 0,258 | 0,295 | 0,379 | 0,550 | 0,750 | 0,940 | |
| | | 0,221 | 0,224 | 0,261 | 0,317 | 0,422 | 0,612 | 0,809 | 1,080 | |
| H5A | | 0,238 | 0,253 | 0,308 | 0,353 | 0,457 | 0,650 | 0,903 | 1,100 | |
| | | 0,222 | 0,225 | 0,260 | 0,315 | 0,417 | 0,620 | 0,823 | 0,987 | |
| H5B | | 0,235 | 0,249 | 0,287 | 0,370 | 0,474 | 0,692 | 0,879 | 1,042 | |
| | | 0,228 | 0,245 | 0,294 | 0,367 | 0,500 | 0,723 | 0,916 | 1,043 | |
| H5C | | 0,225 | 0,231 | 0,274 | 0,304 | 0,406 | 0,635 | 0,846 | 0,963 | |
| | | 0,232 | 0,238 | 0,275 | 0,343 | 0,452 | 0,624 | 0,803 | 0,928 | |
| H5D | | 0,238 | 0,234 | 0,271 | 0,310 | 0,409 | 0,633 | 0,897 | 1,066 | |
| | | 0,229 | 0,234 | 0,245 | 0,288 | 0,398 | 0,597 | 0,846 | 0,990 | |
| H5E | | 0,231 | 0,226 | 0,266 | 0,353 | 0,481 | 0,704 | 0,887 | 0,899 | |
| | | 0,245 | 0,242 | 0,282 | 0,349 | 0,469 | 0,694 | 0,936 | 1,064 | |
| H5F | | 0,245 | 0,244 | 0,268 | 0,338 | 0,440 | 0,693 | 0,929 | 1,032 | |
| | | 0,222 | 0,219 | 0,252 | 0,339 | 0,471 | 0,705 | 0,906 | 0,984 | |

Tabla A X.6. Porcentajes de inhibición. Ensayo **CON** adición de medio nutriente (*L. galbana*-Ría de Huelva)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| H1A | -160,00 | -82,35 | -49,54 | -26,73 | -6,55 | 12,10 | 14,95 |
| H1B | -600,00 | -138,24 | -71,56 | -38,25 | -12,62 | -5,11 | -1,45 |
| H1C | -60,00 | -23,53 | -9,17 | 2,30 | 11,41 | 17,21 | 15,24 |
| H2A | -120,00 | -38,24 | -33,03 | -15,67 | -3,64 | 11,07 | 20,46 |
| H2B | -40,00 | 5,88 | -19,27 | -12,90 | -2,91 | 5,79 | 9,14 |
| H2C | -240,00 | -85,29 | -58,72 | -36,87 | -25,97 | -10,90 | -2,61 |
| H3A | 0,00 | 17,65 | -11,01 | -11,52 | -2,91 | 6,64 | 12,19 |
| H3C | 60,00 | 20,59 | -2,75 | -25,35 | 4,61 | 9,20 | 12,19 |
| H4A | -100,00 | 0,00 | -8,26 | -27,19 | -0,97 | 6,47 | 17,27 |
| H4B | -260,00 | 11,76 | 6,42 | -11,98 | 14,81 | 19,08 | 16,69 |
| H4C | -80,00 | 14,71 | -21,10 | -17,05 | -12,38 | -4,77 | 14,66 |
| H5A | 80,00 | 58,82 | -4,59 | -4,61 | -1,70 | 7,84 | 18,14 |
| H5B | 220,00 | 73,53 | 25,69 | 17,97 | 15,53 | 13,46 | 17,71 |
| H5C | 20,00 | 35,29 | -12,84 | -7,37 | -2,67 | 1,53 | 4,06 |
| H5D | -80,00 | -26,47 | -39,45 | -21,66 | -7,28 | 8,69 | 15,38 |
| H5E | -180,00 | 5,88 | 3,67 | 9,22 | 11,89 | 14,82 | 7,98 |
| H5F | -140,00 | -20,59 | -3,67 | 2,30 | 13,11 | 16,52 | 12,48 |

Tabla A X.7. Porcentajes de inhibición. Ensayo **SIN** adición de medio nutriente (*L. galbana*-Ría de Huelva)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|---------|---------|---------|--------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| H1A | -97,01 | -133,33 | -123,81 | -39,29 | 20,93 | 185,71 | 130,00 |
| H1B | -104,48 | -119,05 | -64,29 | 42,86 | 76,74 | 347,62 | 293,33 |
| H1C | -101,49 | -147,62 | -126,19 | -92,86 | -2,33 | 204,76 | 183,33 |
| H2A | -104,48 | -145,24 | -114,29 | -50,00 | 34,88 | 314,29 | 246,67 |
| H2B | -104,48 | -150,00 | -121,43 | -107,14 | -16,28 | 185,71 | 153,33 |
| H2C | -92,54 | -126,19 | -90,48 | -25,00 | 48,84 | 342,86 | 276,67 |
| H3A | -110,45 | -152,38 | -121,43 | -71,43 | 9,30 | 204,76 | 196,67 |
| H3C | -113,43 | -133,33 | -85,71 | 3,57 | 69,77 | 423,81 | 303,33 |
| H4A | -101,49 | -121,43 | -80,95 | 3,57 | 65,12 | 390,48 | 143,33 |
| H4B | -74,63 | -95,24 | -73,81 | -7,14 | 34,88 | 190,48 | 273,33 |
| H4C | -104,48 | -114,29 | -90,48 | 7,14 | 65,12 | 352,38 | 253,33 |
| H5A | -101,49 | -142,86 | -116,67 | -57,14 | 48,84 | 309,52 | 266,67 |
| H5B | -110,45 | -166,67 | -128,57 | -75,00 | 16,28 | 280,95 | 240,00 |
| H5C | -105,97 | -130,95 | -90,48 | 25,00 | 55,81 | 376,19 | 300,00 |
| H5D | -105,97 | -140,48 | -92,86 | -50,00 | 41,86 | 342,86 | 303,33 |
| H5E | -88,06 | -154,76 | -147,62 | -139,29 | -2,33 | 209,52 | 190,00 |
| H5F | -102,99 | -176,19 | -185,71 | -203,57 | -81,40 | 0,00 | -3,33 |

Tabla A X.8. Índice de eutrofización $-I_E-$ (*L. galbana*-Ría de Huelva)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| H1A | -13,400 | -1,235 | -0,385 | -0,129 | -0,104 | -0,036 | -0,044 |
| H1B | 0,667 | 2,333 | 0,182 | -0,107 | -0,135 | -0,091 | -0,087 |
| H1C | -0,120 | -0,615 | -0,484 | -0,299 | -0,211 | -0,169 | -0,174 |
| H2A | 0,500 | 0,769 | 0,111 | -0,009 | -0,092 | -0,093 | -0,107 |
| H2B | -3,000 | 0,905 | 0,082 | -0,077 | -0,146 | -0,133 | -0,125 |
| H2C | 1,000 | 0,583 | 0,102 | 0,011 | -0,090 | -0,097 | -0,101 |
| H3A | 0,714 | 2,200 | -0,089 | -0,153 | -0,210 | -0,178 | -0,168 |
| H3C | 1,400 | 0,550 | 0,093 | -0,042 | -0,118 | -0,102 | -0,115 |
| H4A | 1,125 | 0,341 | -0,057 | -0,179 | -0,169 | -0,172 | -0,157 |
| H4B | (*) | 0,265 | -0,080 | -0,184 | -0,174 | -0,165 | -0,090 |
| H4C | 2,125 | -0,053 | -0,095 | -0,136 | -0,123 | -0,087 | -0,139 |
| H5A | 3,000 | 0,154 | -0,047 | -0,167 | -0,197 | -0,170 | -0,134 |
| H5B | 0,111 | 0,333 | 0,067 | -0,058 | -0,158 | -0,136 | -0,135 |
| H5C | 0,438 | 0,475 | 0,088 | -0,027 | -0,105 | -0,120 | -0,126 |
| H5D | 0,667 | 0,283 | -0,042 | -0,174 | -0,167 | -0,168 | -0,167 |
| H5E | 4,000 | 0,680 | -0,045 | -0,082 | -0,160 | -0,146 | -0,152 |
| H5F | 2,000 | 0,639 | 0,177 | 0,046 | -0,091 | -0,096 | -0,117 |

(*) División por cero

2.1.3. *Tetraselmis chuii*

Tabla A X.9.

Evolución de la biomasa de *Tetraselmis chuii*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| | | <i>T. chuii</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|----|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Ensayo <u>CON</u> adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | | Ensayo <u>SIN</u> adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | | |
| Control | | 0,237 | 0,208 | 0,413 | 0,762 | 0,940 | 1,205 | 1,388 | 1,556 | 0,217 | 0,220 | 0,286 | 0,374 | 0,406 | 0,383 | 0,380 | 0,378 |
| | | 0,225 | 0,150 | 0,249 | 0,544 | 0,832 | 1,131 | 1,278 | 1,357 | 0,215 | 0,149 | 0,173 | 0,267 | 0,359 | 0,360 | 0,340 | 0,330 |
| | | 0,243 | 0,187 | 0,241 | 0,459 | 0,811 | 1,176 | 1,307 | 1,446 | 0,223 | 0,186 | 0,167 | 0,225 | 0,350 | 0,374 | 0,361 | 0,351 |
| | | 0,236 | 0,196 | 0,244 | 0,449 | 0,797 | 1,160 | 1,350 | 1,447 | 0,220 | 0,195 | 0,169 | 0,220 | 0,345 | 0,369 | 0,359 | 0,351 |
| H1A | | 0,211 | 0,141 | 0,202 | 0,352 | 0,689 | 0,947 | 1,022 | 1,003 | 0,208 | 0,179 | 0,261 | 0,301 | 0,323 | 0,336 | 0,339 | 0,351 |
| | | 0,201 | 0,121 | 0,136 | 0,205 | 0,513 | 0,931 | 1,146 | 1,316 | 0,194 | 0,171 | 0,234 | 0,271 | 0,291 | 0,302 | 0,304 | 0,295 |
| H1B | | 0,211 | 0,163 | 0,190 | 0,371 | 0,638 | 0,882 | 1,014 | 1,093 | 0,210 | 0,193 | 0,256 | 0,295 | 0,319 | 0,330 | 0,334 | 0,328 |
| | | 0,196 | 0,121 | 0,141 | 0,211 | 0,541 | 0,928 | 1,124 | 1,318 | 0,204 | 0,199 | 0,256 | 0,282 | 0,311 | 0,323 | 0,333 | 0,341 |
| H1C | | 0,185 | 0,101 | 0,145 | 0,217 | 0,641 | 1,014 | 1,176 | 1,340 | 0,185 | 0,167 | 0,225 | 0,266 | 0,306 | 0,338 | 0,351 | 0,354 |
| | | 0,210 | 0,154 | 0,180 | 0,237 | 0,534 | 0,926 | 1,153 | 1,310 | 0,199 | 0,174 | 0,235 | 0,278 | 0,314 | 0,344 | 0,352 | 0,357 |
| H2A | | 0,210 | 0,174 | 0,306 | 0,789 | 1,048 | 1,372 | 1,561 | 1,722 | 0,227 | 0,241 | 0,287 | 0,322 | 0,352 | 0,365 | 0,361 | 0,353 |
| | | 0,212 | 0,159 | 0,260 | 0,626 | 0,798 | 1,127 | 1,287 | 1,413 | 0,230 | 0,222 | 0,284 | 0,321 | 0,341 | 0,369 | 0,353 | 0,340 |
| H2B | | 0,215 | 0,182 | 0,324 | 0,721 | 0,892 | 1,138 | 1,318 | 1,371 | 0,198 | 0,197 | 0,274 | 0,310 | 0,338 | 0,344 | 0,353 | 0,346 |
| | | 0,217 | 0,185 | 0,251 | 0,599 | 0,789 | 1,034 | 1,204 | 1,270 | 0,237 | 0,220 | 0,302 | 0,353 | 0,368 | 0,383 | 0,397 | 0,383 |
| H2C | | 0,218 | 0,177 | 0,272 | 0,636 | 0,874 | 1,190 | 1,392 | 1,522 | 0,233 | 0,224 | 0,292 | 0,334 | 0,356 | 0,375 | 0,377 | 0,377 |
| | | 0,208 | 0,159 | 0,200 | 0,488 | 0,857 | 1,210 | 1,418 | 1,557 | 0,210 | 0,191 | 0,260 | 0,302 | 0,332 | 0,342 | 0,348 | 0,323 |
| H3A | | 0,211 | 0,174 | 0,315 | 0,717 | 0,893 | 1,167 | 1,331 | 1,416 | 0,223 | 0,229 | 0,291 | 0,320 | 0,344 | 0,353 | 0,350 | 0,359 |
| | | 0,211 | 0,170 | 0,247 | 0,604 | 0,860 | 1,156 | 1,339 | 1,486 | 0,210 | 0,203 | 0,275 | 0,308 | 0,322 | 0,328 | 0,341 | 0,340 |
| H3C | | 0,203 | 0,172 | 0,321 | 0,735 | 0,925 | 1,207 | 1,382 | 1,461 | 0,217 | 0,203 | 0,275 | 0,305 | 0,323 | 0,328 | 0,342 | 0,331 |
| | | 0,244 | 0,201 | 0,292 | 0,596 | 0,720 | 0,932 | 1,083 | 1,174 | 0,202 | 0,193 | 0,253 | 0,277 | 0,307 | 0,318 | 0,319 | 0,309 |
| H4A | | 0,220 | 0,192 | 0,322 | 0,750 | 0,880 | 1,181 | 1,397 | 1,494 | 0,239 | 0,209 | 0,302 | 0,328 | 0,352 | 0,355 | 0,371 | 0,369 |
| | | 0,225 | 0,205 | 0,294 | 0,629 | 0,825 | 1,120 | 1,315 | 1,426 | 0,229 | 0,221 | 0,292 | 0,323 | 0,346 | 0,363 | 0,358 | 0,359 |
| H4B | | 0,227 | 0,157 | 0,180 | 0,521 | 0,685 | 0,882 | 1,021 | 1,100 | 0,239 | 0,239 | 0,321 | 0,354 | 0,363 | 0,363 | 0,379 | 0,376 |
| | | 0,239 | 0,200 | 0,286 | 0,650 | 0,904 | 1,260 | 1,471 | 1,590 | 0,223 | 0,214 | 0,289 | 0,332 | 0,357 | 0,359 | 0,366 | 0,366 |
| H4C | | 0,230 | 0,197 | 0,344 | 0,755 | 0,895 | 1,184 | 1,383 | 1,461 | 0,226 | 0,211 | 0,285 | 0,320 | 0,327 | 0,341 | 0,344 | 0,342 |
| | | 0,244 | 0,207 | 0,290 | 0,651 | 0,876 | 1,171 | 1,311 | 1,445 | 0,239 | 0,220 | 0,285 | 0,342 | 0,342 | 0,350 | 0,349 | 0,324 |
| H5A | | 0,261 | 0,216 | 0,335 | 0,781 | 0,969 | 1,275 | 1,459 | 1,566 | 0,229 | 0,220 | 0,281 | 0,319 | 0,342 | 0,349 | 0,361 | 0,354 |
| | | 0,266 | 0,213 | 0,302 | 0,680 | 0,890 | 1,195 | 1,352 | 1,497 | 0,234 | 0,218 | 0,286 | 0,322 | 0,342 | 0,352 | 0,363 | 0,359 |
| H5B | | 0,228 | 0,196 | 0,366 | 0,723 | 0,894 | 1,149 | 1,289 | 1,406 | 0,207 | 0,218 | 0,288 | 0,318 | 0,344 | 0,353 | 0,367 | 0,379 |
| | | 0,217 | 0,181 | 0,272 | 0,609 | 0,824 | 1,099 | 1,212 | 1,352 | 0,230 | 0,243 | 0,296 | 0,342 | 0,358 | 0,375 | 0,382 | 0,367 |
| H5C | | 0,217 | 0,182 | 0,325 | 0,658 | 0,842 | 1,115 | 1,260 | 1,397 | 0,214 | 0,209 | 0,274 | 0,313 | 0,330 | 0,334 | 0,341 | 0,329 |
| | | 0,243 | 0,207 | 0,285 | 0,610 | 0,754 | 0,938 | 1,078 | 1,135 | 0,222 | 0,215 | 0,285 | 0,313 | 0,340 | 0,345 | 0,349 | 0,349 |
| H5D | | 0,214 | 0,155 | 0,337 | 0,646 | 0,751 | 0,917 | 1,070 | 1,132 | 0,207 | 0,216 | 0,239 | 0,304 | 0,328 | 0,330 | 0,334 | 0,329 |
| | | 0,222 | 0,180 | 0,247 | 0,609 | 0,845 | 1,163 | 1,327 | 1,453 | 0,195 | 0,186 | 0,255 | 0,279 | 0,309 | 0,320 | 0,319 | 0,372 |
| H5E | | 0,213 | 0,169 | 0,217 | 0,526 | 0,776 | 1,033 | 1,225 | 1,360 | 0,209 | 0,190 | 0,234 | 0,281 | 0,300 | 0,330 | 0,336 | 0,340 |
| | | 0,231 | 0,178 | 0,200 | 0,382 | 0,712 | 1,003 | 1,179 | 1,281 | 0,210 | 0,198 | 0,227 | 0,259 | 0,286 | 0,312 | 0,332 | 0,338 |
| H5F | | 0,190 | 0,124 | 0,178 | 0,393 | 0,661 | 0,902 | 1,052 | 1,100 | 0,200 | 0,191 | 0,243 | 0,285 | 0,324 | 0,340 | 0,358 | 0,363 |
| | | 0,216 | 0,157 | 0,190 | 0,383 | 0,680 | 1,043 | 1,242 | 1,369 | 0,220 | 0,188 | 0,263 | 0,308 | 0,347 | 0,367 | 0,380 | 0,380 |

Tabla A X.10. Porcentajes de inhibición. Ensayo CON adición de medio nutriente (*T. chuii*-Ría de Huelva)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| H1A | 50,00 | -171,15 | -77,04 | -35,25 | -21,44 | -19,89 | -21,55 |
| H1B | 24,00 | -173,08 | -72,33 | -36,72 | -24,76 | -20,99 | -17,60 |
| H1C | 40,00 | -167,31 | -90,57 | -36,07 | -17,15 | -11,77 | -7,24 |
| H2A | -10,00 | 38,46 | 56,29 | 16,72 | 11,36 | 10,68 | 11,60 |
| H2B | -34,00 | 38,46 | 39,62 | 2,46 | -6,75 | -4,65 | -9,13 |
| H2C | -10,00 | -55,77 | 9,75 | 7,05 | 5,79 | 8,76 | 9,13 |
| H3A | -22,00 | 34,62 | 41,51 | 9,18 | 1,93 | 2,55 | 1,97 |
| H3C | -26,00 | 59,62 | 38,99 | -1,80 | -9,32 | -7,94 | -10,03 |
| H4A | -52,00 | 65,38 | 46,86 | 3,28 | -0,54 | 3,47 | 1,81 |
| H4B | -62,00 | 21,15 | -71,07 | -81,15 | -86,60 | -88,05 | -89,31 |
| H4C | -30,00 | 53,85 | 46,54 | 6,39 | 0,86 | 1,28 | 0,00 |
| H5A | -2,00 | 5,77 | 46,86 | 9,18 | 4,18 | 4,20 | 4,28 |
| H5B | -32,00 | 86,54 | 39,62 | 4,43 | -3,32 | -6,20 | -4,85 |
| H5C | -28,00 | 44,23 | 27,04 | -6,89 | -14,58 | -14,32 | -14,80 |
| H5D | 2,00 | 42,31 | 28,93 | -4,92 | -11,90 | -10,49 | -11,60 |
| H5E | -2,00 | -126,92 | -27,04 | -14,43 | -14,68 | -10,58 | -9,62 |
| H5F | 26,00 | -136,54 | -41,82 | -23,28 | -17,47 | -13,87 | -15,13 |

Tabla A X.11. Porcentajes de inhibición. Ensayo SIN adición de medio nutriente (*T. chuii*-Ría de Huelva)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| H1A | -16,13 | -335,00 | 60,38 | -27,40 | -22,88 | -14,18 | -8,96 |
| H1B | -64,52 | -345,00 | 54,72 | -26,03 | -21,57 | -9,93 | -4,48 |
| H1C | -29,03 | -290,00 | 50,94 | -19,18 | -2,61 | 13,48 | 22,39 |
| H2A | -109,68 | -385,00 | 75,47 | -19,18 | -9,15 | -8,51 | -11,94 |
| H2B | -70,97 | -455,00 | 115,09 | -6,85 | -4,58 | 12,06 | 9,70 |
| H2C | -54,84 | -375,00 | 83,02 | -15,75 | -10,46 | 0,00 | -3,73 |
| H3A | -100,00 | -435,00 | 84,91 | -19,86 | -18,95 | -8,51 | -0,75 |
| H3C | -61,29 | -375,00 | 54,72 | -27,40 | -25,49 | -14,18 | -17,16 |
| H4A | 77,42 | -100,00 | 566,04 | 284,93 | 447,71 | 618,44 | 729,85 |
| H4B | -83,87 | -470,00 | 111,32 | -11,64 | -15,03 | 0,71 | 4,48 |
| H4C | -45,16 | -365,00 | 86,79 | -30,14 | -26,14 | -19,15 | -24,63 |
| H5A | -58,06 | -360,00 | 67,92 | -23,97 | -22,22 | -7,09 | -6,72 |
| H5B | -138,71 | -470,00 | 111,32 | -8,90 | -4,58 | 10,64 | 15,67 |
| H5C | -80,65 | -410,00 | 79,25 | -19,86 | -20,26 | -9,93 | -9,70 |
| H5D | -100,00 | -330,00 | 71,70 | -19,18 | -18,95 | -10,64 | -11,94 |
| H5E | -48,39 | -205,00 | 15,09 | -42,47 | -26,80 | -11,35 | -2,99 |
| H5F | -32,26 | -315,00 | 64,15 | -13,70 | -5,88 | 12,77 | 20,90 |

Tabla A X.12. Índice de eutrofización $-I_E-$ (*T. chuii*-Ría de Huelva)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| SW | 0,620 | -0,385 | 0,167 | 0,239 | 0,164 | 0,129 | 0,110 |
| H1A | 0,347 | -1,270 | 1,164 | 0,268 | 0,161 | 0,138 | 0,128 |
| H1B | 0,177 | -1,289 | 0,932 | 0,280 | 0,171 | 0,147 | 0,128 |
| H1C | 0,314 | -1,086 | 2,667 | 0,303 | 0,193 | 0,165 | 0,145 |
| H2A | -0,067 | 0,792 | 0,187 | 0,166 | 0,134 | 0,106 | 0,087 |
| H2B | 0,273 | 0,986 | 0,257 | 0,218 | 0,168 | 0,151 | 0,133 |
| H2C | 0,311 | 2,391 | 0,278 | 0,188 | 0,139 | 0,118 | 0,097 |
| H3A | 0,000 | 0,957 | 0,218 | 0,176 | 0,130 | 0,115 | 0,107 |
| H3C | 0,324 | 0,663 | 0,186 | 0,177 | 0,135 | 0,120 | 0,101 |
| H4A | 2,292 | 0,000 | 0,756 | 0,892 | 0,903 | 0,893 | 0,898 |
| H4B | 0,263 | 1,175 | 1,217 | 1,122 | 1,040 | 1,084 | 1,077 |
| H4C | 0,486 | 0,663 | 0,212 | 0,157 | 0,120 | 0,103 | 0,083 |
| H5A | 0,265 | 0,945 | 0,191 | 0,167 | 0,122 | 0,115 | 0,099 |
| H5B | -0,353 | 0,763 | 0,252 | 0,209 | 0,162 | 0,152 | 0,134 |
| H5C | 0,167 | 0,827 | 0,235 | 0,206 | 0,153 | 0,135 | 0,117 |
| H5D | 0,000 | 0,622 | 0,222 | 0,203 | 0,151 | 0,128 | 0,140 |
| H5E | 0,327 | -1,500 | 0,263 | 0,161 | 0,141 | 0,128 | 0,118 |
| H5F | 0,333 | -2,263 | 0,470 | 0,269 | 0,187 | 0,168 | 0,157 |

2.1.4 *Thalassiosira pseudonana*

Tabla A X.13.

Evolución de la biomasa de *Thalassiosira pseudonana*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| | | <i>T. pseudonana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | |
|---------|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | | Ensayo <u>CON</u> adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| Control | | 0,085 | 0,116 | 0,197 | 0,291 | 0,395 | 0,554 | 0,678 | 0,778 | |
| | | 0,092 | 0,122 | 0,202 | 0,293 | 0,382 | 0,543 | 0,668 | 0,734 | |
| | | 0,085 | 0,110 | 0,185 | 0,247 | 0,321 | 0,474 | 0,627 | 0,760 | |
| | | 0,079 | 0,099 | 0,173 | 0,258 | 0,337 | 0,485 | 0,632 | 0,733 | |
| H1A | | 0,080 | 0,100 | 0,160 | 0,255 | 0,346 | 0,508 | 0,644 | 0,726 | |
| | | 0,080 | 0,093 | 0,145 | 0,214 | 0,318 | 0,466 | 0,611 | 0,691 | |
| H1B | | 0,121 | 0,107 | 0,155 | 0,218 | 0,327 | 0,464 | 0,592 | 0,698 | |
| | | 0,116 | 0,119 | 0,160 | 0,225 | 0,325 | 0,472 | 0,589 | 0,661 | |
| H1C | | 0,093 | 0,112 | 0,156 | 0,218 | 0,328 | 0,437 | 0,589 | 0,618 | |
| | | 0,083 | 0,108 | 0,150 | 0,214 | 0,314 | 0,441 | 0,588 | 0,681 | |
| H2A | | 0,095 | 0,113 | 0,157 | 0,220 | 0,324 | 0,457 | 0,570 | 0,684 | |
| | | 0,099 | 0,115 | 0,160 | 0,229 | 0,339 | 0,484 | 0,620 | 0,696 | |
| H2B | | 0,104 | 0,119 | 0,172 | 0,232 | 0,334 | 0,465 | 0,616 | 0,693 | |
| | | 0,092 | 0,102 | 0,158 | 0,211 | 0,320 | 0,461 | 0,576 | 0,681 | |
| H2C | | 0,064 | 0,080 | 0,113 | 0,158 | 0,249 | 0,416 | 0,561 | 0,648 | |
| | | 0,083 | 0,097 | 0,137 | 0,172 | 0,264 | 0,407 | 0,551 | 0,669 | |
| H3A | | 0,096 | 0,101 | 0,145 | 0,194 | 0,285 | 0,407 | 0,516 | 0,674 | |
| | | 0,073 | 0,095 | 0,132 | 0,177 | 0,254 | 0,390 | 0,541 | 0,607 | |
| H3C | | 0,088 | 0,117 | 0,157 | 0,211 | 0,299 | 0,416 | 0,564 | 0,660 | |
| | | 0,083 | 0,097 | 0,141 | 0,209 | 0,294 | 0,437 | 0,577 | 0,674 | |
| H4A | | 0,122 | 0,115 | 0,153 | 0,206 | 0,296 | 0,426 | 0,584 | 0,686 | |
| | | 0,099 | 0,109 | 0,141 | 0,191 | 0,248 | 0,274 | 0,352 | 0,478 | |
| H4B | | 0,117 | 0,086 | 0,130 | 0,185 | 0,270 | 0,353 | 0,517 | 0,640 | |
| | | 0,112 | 0,090 | 0,136 | 0,195 | 0,288 | 0,406 | 0,558 | 0,667 | |
| H4C | | 0,095 | 0,086 | 0,129 | 0,168 | 0,259 | 0,369 | 0,471 | 0,475 | |
| | | 0,086 | 0,090 | 0,130 | 0,182 | 0,261 | 0,370 | 0,518 | 0,590 | |
| H5A | | 0,091 | 0,103 | 0,145 | 0,197 | 0,281 | 0,384 | 0,532 | 0,653 | |
| | | 0,090 | 0,100 | 0,138 | 0,179 | 0,251 | 0,372 | 0,509 | 0,549 | |
| H5B | | 0,090 | 0,110 | 0,148 | 0,200 | 0,286 | 0,435 | 0,583 | 0,689 | |
| | | 0,085 | 0,094 | 0,144 | 0,202 | 0,294 | 0,440 | 0,583 | 0,682 | |
| H5C | | 0,090 | 0,105 | 0,147 | 0,205 | 0,303 | 0,434 | 0,553 | 0,648 | |
| | | 0,101 | 0,110 | 0,160 | 0,215 | 0,308 | 0,431 | 0,577 | 0,732 | |
| H5D | | 0,108 | 0,124 | 0,175 | 0,231 | 0,342 | 0,461 | 0,594 | 0,669 | |
| | | 0,057 | 0,078 | 0,121 | 0,176 | 0,268 | 0,364 | 0,490 | 0,579 | |
| H5E | | 0,100 | 0,114 | 0,176 | 0,259 | 0,356 | 0,494 | 0,639 | 0,728 | |
| | | 0,105 | 0,120 | 0,179 | 0,258 | 0,342 | 0,475 | 0,600 | 0,680 | |
| H5F | | 0,091 | 0,116 | 0,175 | 0,255 | 0,345 | 0,491 | 0,598 | 0,667 | |
| | | 0,096 | 0,113 | 0,177 | 0,265 | 0,352 | 0,502 | 0,630 | 0,721 | |

Tabla A X.14. Porcentajes de inhibición. Ensayo **CON** adición de medio nutriente (*T. pseudonana*-Ría de Huelva)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| H1A | -37,04 | -29,81 | -17,11 | -8,03 | -5,13 | -3,18 | -5,56 |
| H1B | -122,22 | -62,50 | -44,92 | -24,09 | -18,41 | -16,61 | -15,77 |
| H1C | -18,52 | -37,50 | -31,55 | -14,96 | -18,18 | -11,48 | -15,62 |
| H2A | -37,04 | -40,38 | -31,55 | -14,23 | -12,82 | -12,01 | -10,96 |
| H2B | -51,85 | -35,58 | -33,69 | -16,42 | -14,92 | -12,01 | -11,56 |
| H2C | -44,44 | -50,00 | -50,80 | -33,21 | -21,21 | -14,66 | -12,16 |
| H3A | -48,15 | -48,08 | -45,99 | -32,48 | -26,81 | -21,55 | -16,52 |
| H3C | -18,52 | -38,46 | -33,16 | -22,99 | -20,51 | -14,31 | -12,61 |
| H4A | -92,59 | -64,42 | -52,94 | -40,88 | -44,06 | -36,75 | -29,13 |
| H4B | -200,00 | -81,73 | -59,36 | -39,78 | -38,23 | -25,27 | -19,07 |
| H4C | -111,11 | -62,50 | -54,55 | -37,96 | -34,97 | -28,62 | -33,63 |
| H5A | -59,26 | -50,96 | -47,59 | -35,77 | -32,87 | -24,03 | -23,27 |
| H5B | -44,44 | -43,27 | -39,04 | -25,91 | -18,41 | -12,37 | -10,21 |
| H5C | -55,56 | -44,23 | -38,50 | -23,36 | -21,45 | -16,96 | -10,66 |
| H5D | -29,63 | -36,54 | -35,29 | -18,61 | -23,08 | -18,73 | -18,62 |
| H5E | -44,44 | -27,88 | -16,58 | -9,85 | -10,96 | -8,66 | -9,61 |
| H5F | -22,22 | -20,19 | -10,70 | -6,93 | -6,06 | -7,95 | -9,76 |

Tabla A X.15. Porcentajes de inhibición. Ensayo **SIN** adición de medio nutriente (*T. pseudonana*-Ría de Huelva)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| H1A | -9,52 | 733,33 | 614,29 | 1155,56 | 1585,71 | 687,50 | 630,77 |
| H1B | -9,52 | 555,56 | 478,57 | 1044,44 | 1371,43 | 500,00 | 638,46 |
| H1C | 28,57 | 611,11 | 557,14 | 1100,00 | 1442,86 | 531,25 | 638,46 |
| H2A | 28,57 | 722,22 | 578,57 | 1188,89 | 1614,29 | 587,50 | 707,69 |
| H2B | 23,81 | 666,67 | 571,43 | 1244,44 | 1757,14 | 831,25 | 961,54 |
| H2C | -19,05 | 422,22 | 464,29 | 988,89 | 1157,14 | 400,00 | 438,46 |
| H3A | 19,05 | 666,67 | 507,14 | 1011,11 | 1271,43 | 500,00 | 507,69 |
| H3C | 28,57 | 688,89 | 514,29 | 1044,44 | 1257,14 | 437,50 | 476,92 |
| H4A | -80,95 | 377,78 | 392,86 | 955,56 | 1328,57 | 475,00 | 646,15 |
| H4B | -133,33 | 244,44 | 307,14 | 966,67 | 1028,57 | 306,25 | 415,38 |
| H4C | -42,86 | 511,11 | 457,14 | 844,44 | 785,71 | 243,75 | 246,15 |
| H5A | -85,71 | 311,11 | 350,00 | 922,22 | 1228,57 | 468,75 | 561,54 |
| H5B | 47,62 | 688,89 | 557,14 | 1200,00 | 1685,71 | 687,50 | 823,08 |
| H5C | 9,52 | 655,56 | 557,14 | 1133,33 | 1557,14 | 606,25 | 638,46 |
| H5D | 47,62 | 744,44 | 528,57 | 1000,00 | 1057,14 | 343,75 | 400,00 |
| H5E | -119,05 | 311,11 | 328,57 | 755,56 | 771,43 | 125,00 | 115,38 |
| H5F | 23,81 | 722,22 | 535,71 | 800,00 | 642,86 | 137,50 | 161,54 |

Tabla A X.16. Índice de eutrofización $-I_E-$ (*T. pseudonana*-Ría de Huelva)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| H1A | 0,778 | 0,087 | 0,075 | 0,033 | 0,016 | 0,028 | 0,020 |
| H1B | 1,118 | 1,027 | 0,645 | 0,448 | 0,290 | 0,230 | 0,151 |
| H1C | -3,167 | 1,513 | 0,786 | 0,495 | 0,294 | 0,203 | 0,171 |
| H2A | 1,227 | 0,985 | 0,719 | 0,464 | 0,308 | 0,202 | 0,171 |
| H2B | 1,588 | 1,194 | 0,742 | 0,494 | 0,321 | 0,221 | 0,177 |
| H2C | 2,000 | 1,030 | 0,758 | 0,528 | 0,356 | 0,299 | 0,234 |
| H3A | 1,133 | 0,904 | 0,859 | 0,536 | 0,260 | 0,166 | 0,120 |
| H3C | 1,786 | 1,278 | 0,842 | 0,541 | 0,306 | 0,216 | 0,142 |
| H4A | 1,227 | 1,109 | 0,688 | 0,488 | 0,279 | 0,177 | 0,129 |
| H4B | 2,000 | 1,162 | 0,784 | 0,586 | 0,417 | 0,257 | 0,206 |
| H4C | 0,259 | 1,632 | 0,750 | 0,582 | 0,298 | 0,154 | 0,124 |
| H5A | -4,000 | 1,410 | 0,918 | 0,500 | 0,222 | 0,136 | 0,102 |
| H5B | 0,273 | 0,725 | 0,643 | 0,523 | 0,323 | 0,212 | 0,168 |
| H5C | 2,067 | 1,203 | 0,807 | 0,576 | 0,357 | 0,254 | 0,201 |
| H5D | 1,917 | 1,172 | 0,800 | 0,529 | 0,344 | 0,240 | 0,161 |
| H5E | 1,632 | 1,152 | 0,727 | 0,444 | 0,245 | 0,154 | 0,120 |
| H5F | -0,267 | 0,493 | 0,385 | 0,312 | 0,160 | 0,070 | 0,047 |

2.2. BAHÍA DE CÁDIZ

2.2.1. *Nannochloropsis gaditana*

Tabla A X.17.

Evolución de la biomasa de *Nannochloropsis gaditana*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| | | <i>N. gaditana</i>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Ensayo CON adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | | | Ensayo SIN adición de medio nutriente f/2 | | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| Control | | 0,407 | 0,452 | 0,529 | 0,583 | 0,688 | 1,062 | 1,457 | 1,709 | 0,420 | 0,415 | 0,399 | 0,356 | 0,371 | 0,513 | 0,658 | 0,737 |
| | | 0,409 | 0,462 | 0,522 | 0,557 | 0,637 | 0,991 | 1,382 | 1,609 | 0,422 | 0,424 | 0,394 | 0,340 | 0,343 | 0,479 | 0,624 | 0,694 |
| | | 0,422 | 0,468 | 0,514 | 0,603 | 0,662 | 0,979 | 1,302 | 1,537 | 0,409 | 0,429 | 0,388 | 0,368 | 0,357 | 0,473 | 0,588 | 0,663 |
| | | 0,423 | 0,480 | 0,529 | 0,579 | 0,647 | 0,947 | 1,259 | 1,474 | 0,410 | 0,440 | 0,399 | 0,354 | 0,349 | 0,458 | 0,568 | 0,636 |
| C1A | | 0,408 | 0,459 | 0,489 | 0,568 | 0,615 | 0,957 | 1,266 | 1,506 | 0,408 | 0,505 | 0,548 | 0,595 | 0,600 | 0,633 | 0,714 | 0,719 |
| | | 0,403 | 0,461 | 0,486 | 0,561 | 0,621 | 0,929 | 1,281 | 1,480 | 0,429 | 0,514 | 0,562 | 0,604 | 0,621 | 0,649 | 0,711 | 0,724 |
| C1B | | 0,412 | 0,472 | 0,543 | 0,601 | 0,713 | 0,997 | 1,187 | 1,271 | 0,408 | 0,496 | 0,569 | 0,627 | 0,624 | 0,653 | 0,721 | 0,771 |
| | | 0,405 | 0,478 | 0,528 | 0,591 | 0,708 | 1,055 | 1,348 | 1,563 | 0,407 | 0,512 | 0,603 | 0,667 | 0,700 | 0,819 | 0,931 | 1,003 |
| C1C | | 0,412 | 0,487 | 0,531 | 0,611 | 0,709 | 1,031 | 1,326 | 1,495 | 0,426 | 0,539 | 0,602 | 0,650 | 0,650 | 0,676 | 0,727 | 0,769 |
| | | 0,415 | 0,486 | 0,536 | 0,606 | 0,726 | 1,080 | 1,364 | 1,612 | 0,427 | 0,542 | 0,616 | 0,670 | 0,671 | 0,706 | 0,801 | 0,865 |
| C1D | | 0,414 | 0,482 | 0,549 | 0,636 | 0,702 | 0,814 | 0,870 | 0,936 | 0,425 | 0,532 | 0,592 | 0,639 | 0,648 | 0,652 | 0,708 | 0,739 |
| | | 0,423 | 0,485 | 0,517 | 0,602 | 0,683 | 0,960 | 1,353 | 1,511 | 0,407 | 0,525 | 0,588 | 0,634 | 0,646 | 0,658 | 0,720 | 0,743 |
| C2A | | 0,409 | 0,477 | 0,533 | 0,613 | 0,719 | 1,048 | 1,319 | 1,428 | 0,422 | 0,530 | 0,608 | 0,649 | 0,652 | 0,675 | 0,725 | 0,745 |
| | | 0,425 | 0,496 | 0,545 | 0,620 | 0,712 | 1,028 | 1,336 | 1,549 | 0,411 | 0,536 | 0,609 | 0,666 | 0,669 | 0,698 | 0,773 | 0,809 |
| C2B | | 0,414 | 0,475 | 0,533 | 0,602 | 0,716 | 0,667 | 0,723 | 0,727 | 0,399 | 0,503 | 0,563 | 0,595 | 0,599 | 0,643 | 0,738 | 0,763 |
| | | 0,410 | 0,478 | 0,514 | 0,597 | 0,688 | 0,966 | 1,264 | 1,483 | 0,409 | 0,512 | 0,571 | 0,607 | 0,609 | 0,620 | 0,670 | 0,670 |
| C2C | | 0,408 | 0,483 | 0,534 | 0,626 | 0,754 | 0,947 | 1,102 | 1,316 | 0,402 | 0,517 | 0,588 | 0,637 | 0,640 | 0,680 | 0,749 | 0,741 |
| | | 0,412 | 0,487 | 0,535 | 0,609 | 0,761 | 0,996 | 1,164 | 1,228 | 0,408 | 0,521 | 0,601 | 0,651 | 0,661 | 0,691 | 0,760 | 0,777 |
| C3A | | 0,410 | 0,476 | 0,539 | 0,597 | 0,690 | 1,014 | 1,236 | 1,564 | 0,414 | 0,533 | 0,593 | 0,638 | 0,644 | 0,679 | 0,741 | 0,746 |
| | | 0,407 | 0,482 | 0,518 | 0,602 | 0,680 | 0,953 | 1,264 | 1,504 | 0,411 | 0,525 | 0,587 | 0,640 | 0,651 | 0,680 | 0,742 | 0,752 |
| C3B | | 0,415 | 0,480 | 0,516 | 0,584 | 0,713 | 1,126 | 1,415 | 1,538 | 0,409 | 0,512 | 0,550 | 0,597 | 0,605 | 0,656 | 0,734 | 0,760 |
| | | 0,410 | 0,479 | 0,493 | 0,557 | 0,675 | 1,025 | 1,329 | 1,503 | 0,412 | 0,524 | 0,558 | 0,609 | 0,618 | 0,683 | 0,754 | 0,775 |
| C3C | | 0,408 | 0,487 | 0,531 | 0,630 | 0,746 | 0,978 | 1,074 | 1,199 | 0,406 | 0,520 | 0,589 | 0,646 | 0,647 | 0,664 | 0,704 | 0,677 |
| | | 0,415 | 0,489 | 0,527 | 0,604 | 0,724 | 1,061 | 1,326 | 1,584 | 0,420 | 0,529 | 0,589 | 0,644 | 0,646 | 0,668 | 0,741 | 0,787 |
| C4A | | 0,426 | 0,482 | 0,535 | 0,612 | 0,703 | 1,080 | 1,389 | 1,617 | 0,413 | 0,521 | 0,579 | 0,627 | 0,631 | 0,661 | 0,711 | 0,730 |
| | | 0,407 | 0,492 | 0,505 | 0,575 | 0,651 | 1,077 | 1,327 | 1,546 | 0,426 | 0,538 | 0,590 | 0,626 | 0,646 | 0,681 | 0,731 | 0,747 |
| C4B | | 0,404 | 0,469 | 0,512 | 0,598 | 0,684 | 0,996 | 1,273 | 1,515 | 0,422 | 0,524 | 0,597 | 0,647 | 0,664 | 0,674 | 0,708 | 0,735 |
| | | 0,414 | 0,460 | 0,470 | 0,521 | 0,614 | 1,007 | 1,271 | 1,368 | 0,416 | 0,530 | 0,584 | 0,628 | 0,633 | 0,667 | 0,689 | 0,699 |
| C5A | | 0,611 | 0,690 | 0,735 | 0,830 | 0,965 | 1,369 | 1,666 | 1,777 | 0,662 | 0,781 | 0,889 | 0,949 | 0,989 | 1,015 | 1,129 | 1,131 |
| | | 0,610 | 0,694 | 0,716 | 0,837 | 0,967 | 1,330 | 1,641 | 1,757 | 0,632 | 0,783 | 0,868 | 0,928 | 0,939 | 1,027 | 1,095 | 1,128 |
| C5C | | 0,414 | 0,485 | 0,526 | 0,618 | 0,728 | 1,107 | 1,435 | 1,673 | 0,405 | 0,520 | 0,590 | 0,644 | 0,650 | 0,661 | 0,714 | 0,737 |
| | | 0,420 | 0,496 | 0,541 | 0,593 | 0,672 | 1,013 | 1,304 | 1,545 | 0,410 | 0,525 | 0,582 | 0,637 | 0,643 | 0,652 | 0,712 | 0,720 |
| C5D | | 0,409 | 0,469 | 0,514 | 0,594 | 0,667 | 0,985 | 1,272 | 1,562 | 0,409 | 0,515 | 0,579 | 0,638 | 0,642 | 0,665 | 0,691 | 0,714 |
| | | 0,421 | 0,486 | 0,539 | 0,618 | 0,682 | 1,086 | 1,355 | 1,537 | 0,428 | 0,531 | 0,588 | 0,633 | 0,646 | 0,683 | 0,719 | 0,728 |
| C5E | | 0,422 | 0,486 | 0,528 | 0,616 | 0,698 | 0,969 | 1,282 | 1,567 | 0,413 | 0,508 | 0,610 | 0,660 | 0,658 | 0,711 | 0,793 | 0,852 |
| | | 0,421 | 0,495 | 0,531 | 0,619 | 0,707 | 0,959 | 1,230 | 1,493 | 0,411 | 0,519 | 0,608 | 0,662 | 0,654 | 0,716 | 0,776 | 0,828 |
| C5F | | 0,212 | 0,210 | 0,242 | 0,361 | 0,484 | 0,814 | 1,126 | 1,211 | 0,602 | 0,724 | 0,823 | 0,880 | 0,883 | 0,926 | 1,010 | 1,027 |
| | | 0,217 | 0,215 | 0,247 | 0,366 | 0,489 | 0,819 | 1,131 | 1,216 | 0,605 | 0,727 | 0,826 | 0,883 | 0,886 | 0,929 | 1,013 | 1,030 |

Tabla A X.18. Porcentajes de inhibición. Ensayo CON adición de medio nutriente (*N. gaditana* –B. Cádiz)

| Estación de Muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| C1A | 10,00 | -24,07 | -3,64 | -12,35 | -7,24 | -7,17 | -6,77 |
| C1B | 34,00 | 17,59 | 13,94 | 24,28 | 6,55 | -8,13 | -13,54 |
| C1C | 46,00 | 11,11 | 18,18 | 25,10 | 10,69 | -0,32 | -2,31 |
| C1D | 30,00 | 6,48 | 21,82 | 12,76 | -19,14 | -25,88 | -31,02 |
| C2A | 40,00 | 12,96 | 21,21 | 23,05 | 7,07 | -2,57 | -8,14 |
| C2B | 30,00 | 3,70 | 13,94 | 19,34 | -30,17 | -37,75 | -40,62 |
| C2C | 50,00 | 15,74 | 26,06 | 43,21 | -3,10 | -22,67 | -26,14 |
| C3A | 42,00 | 11,11 | 15,76 | 13,99 | -0,86 | -9,95 | -3,51 |
| C3B | 34,00 | -14,81 | -4,24 | 16,05 | 14,31 | 2,67 | -5,06 |
| C3C | 54,00 | 9,26 | 24,85 | 33,33 | 4,83 | -15,61 | -16,02 |
| C4A | 42,00 | -3,70 | 7,27 | 7,41 | 14,14 | 0,75 | -0,17 |
| C4B | 12,00 | -24,07 | -8,48 | -1,23 | 2,24 | -7,70 | -11,48 |
| C5A | 64,00 | 6,48 | 35,15 | 46,50 | 27,41 | 11,55 | -0,86 |
| C5C | 48,00 | 8,33 | 14,55 | 16,46 | 10,86 | 1,93 | 2,14 |
| C5D | 26,00 | 3,70 | 15,76 | 7,00 | 7,07 | -3,85 | -2,74 |
| C5E | 38,00 | 0,00 | 18,79 | 15,64 | -6,38 | -10,70 | -4,97 |
| C5F | -98,00 | -75,00 | -12,73 | 10,29 | 2,76 | -2,35 | -14,31 |

Tabla A X.19. Porcentajes de inhibición. Ensayo SIN adición de medio nutriente (*N. gaditana* – B. de Cádiz)

| Estación de Muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|----------|---------|---------|--------|--------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| C1A | 658,33 | -785,00 | -396,72 | -420,00 | 243,08 | 51,55 | 13,48 |
| C1B | 708,33 | -995,00 | -493,44 | -525,00 | 406,15 | 115,98 | 79,78 |
| C1C | 850,00 | -1015,00 | -483,61 | -490,00 | 307,69 | 74,23 | 46,44 |
| C1D | 841,67 | -970,00 | -462,30 | -485,00 | 267,69 | 53,61 | 21,72 |
| C2A | 875,00 | -1060,00 | -495,08 | -506,67 | 315,38 | 71,65 | 35,21 |
| C2B | 766,67 | -915,00 | -422,95 | -433,33 | 250,77 | 54,64 | 17,23 |
| C2C | 850,00 | -1050,00 | -491,80 | -510,00 | 332,31 | 80,41 | 32,58 |
| C3A | 875,00 | -990,00 | -472,13 | -491,67 | 310,77 | 69,59 | 26,22 |
| C3B | 800,00 | -820,00 | -416,39 | -435,00 | 298,46 | 72,16 | 33,71 |
| C3C | 833,33 | -980,00 | -480,33 | -490,00 | 289,23 | 59,79 | 19,48 |
| C4A | 816,67 | -925,00 | -439,34 | -465,00 | 287,69 | 55,67 | 19,48 |
| C4B | 800,00 | -960,00 | -459,02 | -483,33 | 287,69 | 44,33 | 11,61 |
| C5A | 1025,00 | -1260,00 | -578,69 | -628,33 | 475,38 | 139,69 | 80,90 |
| C5C | 858,33 | -995,00 | -481,97 | -498,33 | 283,08 | 57,73 | 20,22 |
| C5D | 775,00 | -925,00 | -455,74 | -476,67 | 293,85 | 47,94 | 13,48 |
| C5E | 750,00 | -1085,00 | -508,20 | -506,67 | 364,62 | 92,27 | 60,30 |
| C5F | 933,33 | -1210,00 | -550,82 | -581,67 | 398,46 | 110,82 | 59,55 |

Tabla A X.20. Índice de eutrofización –I_E– (*N. gaditana* –B. Cádiz)

| Estación de Muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| Control | 0,240 | -0,185 | -0,370 | -0,247 | 0,112 | 0,207 | 0,229 |
| C1A | 1,655 | 1,671 | 1,138 | 0,901 | 0,414 | 0,339 | 0,278 |
| C1B | 1,448 | 1,409 | 1,277 | 0,844 | 0,532 | 0,488 | 0,476 |
| C1C | 1,562 | 1,525 | 1,200 | 0,770 | 0,413 | 0,363 | 0,343 |
| C1D | 1,738 | 1,513 | 1,100 | 0,843 | 0,510 | 0,430 | 0,404 |
| C2A | 1,671 | 1,574 | 1,205 | 0,816 | 0,435 | 0,366 | 0,337 |
| C2B | 1,600 | 1,455 | 1,048 | 0,690 | 0,563 | 0,515 | 0,452 |
| C2C | 1,520 | 1,520 | 1,149 | 0,707 | 0,500 | 0,484 | 0,411 |
| C3A | 1,648 | 1,483 | 1,188 | 0,848 | 0,464 | 0,391 | 0,299 |
| C3B | 1,612 | 1,565 | 1,222 | 0,713 | 0,391 | 0,348 | 0,322 |
| C3C | 1,455 | 1,492 | 1,126 | 0,722 | 0,416 | 0,393 | 0,326 |
| C4A | 1,549 | 1,587 | 1,169 | 0,839 | 0,381 | 0,321 | 0,274 |
| C4B | 1,929 | 2,098 | 1,450 | 0,958 | 0,425 | 0,324 | 0,288 |
| C5A | 1,646 | 2,017 | 1,309 | 0,890 | 0,506 | 0,446 | 0,417 |
| C5C | 1,554 | 1,530 | 1,233 | 0,845 | 0,387 | 0,321 | 0,269 |
| C5D | 1,667 | 1,473 | 1,136 | 0,869 | 0,412 | 0,319 | 0,267 |
| C5E | 1,478 | 1,824 | 1,270 | 0,868 | 0,556 | 0,447 | 0,386 |
| C5F | 124,000 | 8,222 | 1,910 | 1,078 | 0,544 | 0,448 | 0,426 |

2.2.2. *Isochrysis galbana*Tabla A X.21.
Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| <i>I. galbana</i>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | Ensayo CON adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | | Ensayo SIN adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| Control | 0,146 | 0,129 | 0,155 | 0,235 | 0,291 | 0,470 | 0,633 | 0,728 | 0,159 | 0,097 | 0,119 | 0,138 | 0,138 | 0,143 | 0,164 | 0,164 |
| | 0,155 | 0,152 | 0,175 | 0,238 | 0,261 | 0,476 | 0,594 | 0,685 | 0,168 | 0,115 | 0,135 | 0,141 | 0,124 | 0,145 | 0,154 | 0,155 |
| | 0,127 | 0,125 | 0,168 | 0,229 | 0,272 | 0,429 | 0,602 | 0,722 | 0,138 | 0,094 | 0,129 | 0,135 | 0,129 | 0,131 | 0,157 | 0,163 |
| | 0,150 | 0,145 | 0,169 | 0,239 | 0,273 | 0,444 | 0,613 | 0,713 | 0,163 | 0,110 | 0,131 | 0,141 | 0,130 | 0,135 | 0,159 | 0,161 |
| C1A | 0,142 | 0,142 | 0,173 | 0,259 | 0,330 | 0,537 | 0,698 | 0,832 | 0,132 | 0,13 | 0,114 | 0,127 | 0,122 | 0,124 | 0,107 | 0,087 |
| | 0,155 | 0,154 | 0,178 | 0,260 | 0,342 | 0,544 | 0,767 | 0,933 | 0,142 | 0,136 | 0,123 | 0,140 | 0,132 | 0,130 | 0,126 | 0,117 |
| C1B | 0,145 | 0,140 | 0,172 | 0,257 | 0,327 | 0,542 | 0,815 | 0,982 | 0,135 | 0,136 | 0,124 | 0,146 | 0,135 | 0,151 | 0,183 | 0,159 |
| | 0,131 | 0,141 | 0,168 | 0,254 | 0,336 | 0,568 | 0,802 | 0,973 | 0,127 | 0,129 | 0,118 | 0,136 | 0,133 | 0,132 | 0,177 | 0,156 |
| C1C | 0,146 | 0,146 | 0,163 | 0,238 | 0,277 | 0,432 | 0,579 | 0,540 | 0,139 | 0,147 | 0,136 | 0,136 | 0,116 | 0,139 | 0,117 | 0,076 |
| | 0,130 | 0,134 | 0,143 | 0,211 | 0,257 | 0,422 | 0,546 | 0,491 | 0,142 | 0,150 | 0,140 | 0,146 | 0,125 | 0,130 | 0,123 | 0,075 |
| C1D | 0,125 | 0,129 | 0,138 | 0,202 | 0,256 | 0,437 | 0,655 | 0,739 | 0,130 | 0,131 | 0,113 | 0,118 | 0,101 | 0,083 | 0,128 | 0,059 |
| | 0,133 | 0,141 | 0,143 | 0,207 | 0,269 | 0,443 | 0,671 | 0,754 | 0,138 | 0,138 | 0,125 | 0,129 | 0,121 | 0,124 | 0,147 | 0,078 |
| C2A | 0,136 | 0,138 | 0,153 | 0,215 | 0,261 | 0,420 | 0,652 | 0,746 | 0,137 | 0,144 | 0,126 | 0,134 | 0,123 | 0,108 | 0,136 | 0,083 |
| | 0,150 | 0,158 | 0,170 | 0,229 | 0,259 | 0,400 | 0,638 | 0,705 | 0,131 | 0,137 | 0,120 | 0,123 | 0,096 | 0,101 | 0,122 | 0,071 |
| C2B | 0,132 | 0,137 | 0,167 | 0,237 | 0,325 | 0,556 | 0,818 | 0,957 | 0,133 | 0,142 | 0,144 | 0,152 | 0,154 | 0,163 | 0,203 | 0,175 |
| | 0,131 | 0,137 | 0,161 | 0,235 | 0,329 | 0,549 | 0,817 | 0,954 | 0,130 | 0,137 | 0,130 | 0,140 | 0,140 | 0,134 | 0,161 | 0,136 |
| C2C | 0,125 | 0,132 | 0,137 | 0,194 | 0,230 | 0,416 | 0,604 | 0,628 | 0,153 | 0,162 | 0,147 | 0,153 | 0,142 | 0,123 | 0,143 | 0,084 |
| | 0,135 | 0,136 | 0,153 | 0,218 | 0,268 | 0,450 | 0,610 | 0,612 | 0,156 | 0,160 | 0,141 | 0,145 | 0,125 | 0,116 | 0,128 | 0,063 |
| C3A | 0,143 | 0,139 | 0,159 | 0,229 | 0,303 | 0,487 | 0,696 | 0,861 | 0,135 | 0,137 | 0,138 | 0,161 | 0,157 | 0,189 | 0,213 | 0,174 |
| | 0,143 | 0,139 | 0,162 | 0,221 | 0,270 | 0,449 | 0,681 | 0,823 | 0,164 | 0,158 | 0,148 | 0,162 | 0,161 | 0,185 | 0,213 | 0,185 |
| C3B | 0,141 | 0,140 | 0,164 | 0,246 | 0,323 | 0,556 | 0,787 | 0,910 | 0,145 | 0,135 | 0,123 | 0,146 | 0,125 | 0,132 | 0,156 | 0,116 |
| | 0,135 | 0,136 | 0,155 | 0,242 | 0,331 | 0,564 | 0,810 | 0,929 | 0,127 | 0,129 | 0,116 | 0,136 | 0,125 | 0,128 | 0,167 | 0,113 |
| C3C | 0,151 | 0,152 | 0,167 | 0,236 | 0,290 | 0,485 | 0,656 | 0,785 | 0,132 | 0,137 | 0,129 | 0,140 | 0,137 | 0,143 | 0,158 | 0,151 |
| | 0,140 | 0,140 | 0,159 | 0,225 | 0,290 | 0,448 | 0,653 | 0,784 | 0,159 | 0,161 | 0,151 | 0,169 | 0,160 | 0,182 | 0,201 | 0,168 |
| C4A | 0,137 | 0,148 | 0,154 | 0,211 | 0,258 | 0,452 | 0,683 | 0,819 | 0,136 | 0,142 | 0,134 | 0,146 | 0,108 | 0,119 | 0,203 | 0,175 |
| | 0,157 | 0,171 | 0,159 | 0,230 | 0,285 | 0,521 | 0,736 | 0,902 | 0,137 | 0,143 | 0,133 | 0,142 | 0,117 | 0,118 | 0,179 | 0,152 |
| C4B | 0,130 | 0,129 | 0,141 | 0,201 | 0,241 | 0,383 | 0,532 | 0,438 | 0,157 | 0,149 | 0,135 | 0,145 | 0,129 | 0,134 | 0,130 | 0,084 |
| | 0,156 | 0,158 | 0,159 | 0,202 | 0,236 | 0,380 | 0,529 | 0,514 | 0,139 | 0,141 | 0,126 | 0,124 | 0,109 | 0,110 | 0,120 | 0,052 |
| C5A | 0,222 | 0,192 | 0,198 | 0,254 | 0,325 | 0,614 | 0,914 | 1,006 | 0,296 | 0,293 | 0,279 | 0,302 | 0,286 | 0,339 | 0,398 | 0,276 |
| | 0,216 | 0,182 | 0,209 | 0,275 | 0,333 | 0,562 | 0,849 | 0,912 | 0,259 | 0,258 | 0,241 | 0,247 | 0,223 | 0,272 | 0,322 | 0,244 |
| C5C | 0,135 | 0,142 | 0,149 | 0,210 | 0,264 | 0,402 | 0,524 | 0,534 | 0,122 | 0,125 | 0,112 | 0,128 | 0,120 | 0,103 | 0,101 | 0,045 |
| | 0,133 | 0,133 | 0,144 | 0,199 | 0,246 | 0,383 | 0,537 | 0,546 | 0,124 | 0,128 | 0,115 | 0,115 | 0,092 | 0,071 | 0,098 | 0,046 |
| C5D | 0,145 | 0,135 | 0,148 | 0,221 | 0,257 | 0,440 | 0,628 | 0,693 | 0,147 | 0,147 | 0,132 | 0,145 | 0,132 | 0,136 | 0,144 | 0,106 |
| | 0,155 | 0,153 | 0,149 | 0,208 | 0,261 | 0,467 | 0,690 | 0,804 | 0,137 | 0,140 | 0,120 | 0,115 | 0,099 | 0,107 | 0,150 | 0,110 |
| C5E | 0,137 | 0,138 | 0,219 | 0,236 | 0,303 | 0,505 | 0,719 | 0,794 | 0,138 | 0,141 | 0,147 | 0,166 | 0,158 | 0,178 | 0,218 | 0,180 |
| | 0,138 | 0,133 | 0,143 | 0,238 | 0,303 | 0,504 | 0,722 | 0,865 | 0,142 | 0,156 | 0,156 | 0,187 | 0,181 | 0,203 | 0,247 | 0,208 |
| C5F | 0,212 | 0,210 | 0,242 | 0,361 | 0,484 | 0,814 | 1,126 | 1,211 | 0,223 | 0,219 | 0,217 | 0,245 | 0,243 | 0,284 | 0,332 | 0,303 |
| | 0,219 | 0,215 | 0,244 | 0,365 | 0,491 | 0,819 | 1,128 | 1,209 | 0,225 | 0,222 | 0,214 | 0,249 | 0,250 | 0,289 | 0,334 | 0,301 |

Tabla A X.22. Porcentajes de inhibición. Ensayo CON adición de medio nutriente (*L. galbana*-B. Cádiz)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| C1A | -85,71 | 22,73 | 21,98 | 44,62 | 26,45 | 25,32 | 29,23 |
| C1B | -142,86 | 45,45 | 29,67 | 49,23 | 34,52 | 43,99 | 47,89 |
| C1C | -128,57 | -31,82 | -4,40 | -0,77 | -6,77 | -8,80 | -33,45 |
| C1D | -185,71 | -45,45 | -16,48 | 3,08 | 0,32 | 14,59 | 8,80 |
| C2A | -171,43 | -13,64 | -13,19 | -10,00 | -13,87 | 7,73 | 2,64 |
| C2B | -185,71 | 50,00 | 15,38 | 50,77 | 35,81 | 47,21 | 45,07 |
| C2C | -157,14 | -31,82 | -16,48 | -8,46 | -2,26 | 2,36 | -13,73 |
| C3A | -42,86 | -18,18 | -9,89 | 10,77 | 4,84 | 17,17 | 23,06 |
| C3B | -100,00 | 0,00 | 16,48 | 45,38 | 36,13 | 41,85 | 37,68 |
| C3C | -114,29 | -18,18 | -6,59 | 11,54 | 3,55 | 9,23 | 12,50 |
| C4A | -285,71 | -59,09 | -18,68 | -3,85 | 9,68 | 20,82 | 25,70 |
| C4B | -114,29 | -68,18 | -35,16 | -26,15 | -22,90 | -16,74 | -41,37 |
| C5A | 357,14 | -172,73 | -49,45 | -15,38 | 19,03 | 42,27 | 30,28 |
| C5C | -142,86 | -40,91 | -21,98 | -6,92 | -16,45 | -14,81 | -28,52 |
| C5D | -14,29 | -109,09 | -28,57 | -16,15 | -1,94 | 9,23 | 5,46 |
| C5E | -71,43 | 100,00 | 9,89 | 27,69 | 18,39 | 25,11 | 21,83 |
| C5F | -57,14 | 27,27 | 62,64 | 109,23 | 93,87 | 95,71 | 75,18 |

Tabla A X.23. Porcentajes de inhibición. Ensayo SIN adición de medio nutriente (*L. galbana*- B. Cádiz)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| C1A | -92,45 | -34,48 | -83,33 | -62,96 | -47,37 | -2200,00 | -975,00 |
| C1B | -103,77 | -65,52 | -155,56 | -111,11 | -157,89 | 4800,00 | 575,00 |
| C1C | -115,09 | -93,10 | -105,56 | -25,93 | -68,42 | -2200,00 | -1725,00 |
| C1D | -101,89 | -48,28 | -38,89 | -14,81 | 63,16 | 200,00 | -1750,00 |
| C2A | -111,32 | -62,07 | -66,67 | -7,41 | 57,89 | -600,00 | -1525,00 |
| C2B | -115,09 | -117,24 | -183,33 | -159,26 | -189,47 | 5000,00 | 500,00 |
| C2C | -113,21 | -62,07 | -66,67 | -22,22 | 84,21 | -2000,00 | -2125,00 |
| C3A | -96,23 | -75,86 | -166,67 | -133,33 | -300,00 | 6300,00 | 650,00 |
| C3B | -92,45 | -41,38 | -127,78 | -59,26 | -68,42 | 2500,00 | -650,00 |
| C3C | -107,55 | -79,31 | -150,00 | -111,11 | -189,47 | 3300,00 | 250,00 |
| C4A | -111,32 | -89,66 | -138,89 | -11,11 | -5,26 | 5400,00 | 575,00 |
| C4B | -94,34 | -37,93 | -22,22 | 7,41 | 36,84 | -2400,00 | -2100,00 |
| C5A | -96,23 | -37,93 | -83,33 | -14,81 | -247,37 | 8200,00 | -550,00 |
| C5C | -107,55 | -68,97 | -94,44 | -37,04 | 89,47 | -2500,00 | -2050,00 |
| C5D | -103,77 | -44,83 | -33,33 | 0,00 | 10,53 | 400,00 | -950,00 |
| C5E | -115,09 | -141,38 | -305,56 | -211,11 | -368,42 | 9200,00 | 1250,00 |
| C5F | -92,45 | -68,97 | -227,78 | -185,19 | -431,58 | 10800,00 | 1850,00 |

Tabla A X.24. Índice de eutrofización $-I_E-$ (*L. galbana*- B. Cádiz)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| Control | 7,571 | -1,318 | -0,198 | -0,208 | -0,061 | 0,002 | 0,007 |
| C1A | 4,000 | -0,704 | -0,027 | -0,053 | -0,026 | -0,036 | -0,048 |
| C1B | 0,667 | -0,313 | 0,085 | 0,015 | 0,026 | 0,073 | 0,032 |
| C1C | 4,000 | -0,133 | 0,011 | -0,155 | -0,021 | -0,049 | -0,172 |
| C1D | 0,167 | -1,250 | -0,145 | -0,172 | -0,100 | 0,006 | -0,107 |
| C2A | 1,200 | -0,579 | -0,076 | -0,214 | -0,112 | -0,010 | -0,098 |
| C2B | 1,333 | 0,152 | 0,143 | 0,082 | 0,040 | 0,074 | 0,029 |
| C2C | 1,750 | -0,733 | -0,079 | -0,176 | -0,116 | -0,040 | -0,165 |
| C3A | 0,500 | -0,389 | 0,146 | 0,063 | 0,117 | 0,117 | 0,043 |
| C3B | (*) | -0,773 | 0,047 | -0,058 | -0,014 | 0,039 | -0,028 |
| C3C | 4,000 | -0,333 | 0,106 | 0,021 | 0,053 | 0,067 | 0,022 |
| C4A | 0,462 | -0,333 | 0,095 | -0,192 | -0,053 | 0,098 | 0,038 |
| C4B | -3,000 | -2,571 | -0,237 | -0,302 | -0,109 | -0,059 | -0,240 |
| C5A | 0,063 | 1,125 | -0,065 | -0,209 | 0,076 | 0,125 | -0,024 |
| C5C | 1,333 | -0,692 | -0,014 | -0,140 | -0,139 | -0,060 | -0,192 |
| C5D | -0,333 | 8,000 | -0,185 | -0,248 | -0,069 | 0,010 | -0,057 |
| C5E | -4,000 | 0,273 | 0,370 | 0,181 | 0,139 | 0,160 | 0,078 |
| C5F | 1,333 | -0,321 | 0,155 | 0,085 | 0,105 | 0,120 | 0,078 |

(*) División por cero

2.2.3. *Tetraselmis chuii*

Tabla A X.25.
Evolución de la biomasa de *Tetraselmis chuii*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| | | <i>T. chuii</i>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--|---|-------|-------|-------|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Ensayo <u>CON</u> adición de medio nutriente f/2 | | | | | Ensayo <u>SIN</u> adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 |
| | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| Control | | 0,134 | 0,099 | 0,188 | 0,493 | 0,637 | 0,940 | 1,080 | 1,173 | 0,123 | 0,099 | 0,130 | 0,242 | 0,275 | 0,299 | 0,297 | 0,285 |
| | | 0,162 | 0,113 | 0,185 | 0,466 | 0,678 | 0,990 | 1,170 | 1,335 | 0,149 | 0,113 | 0,128 | 0,229 | 0,293 | 0,315 | 0,322 | 0,324 |
| | | 0,144 | 0,101 | 0,162 | 0,424 | 0,655 | 0,953 | 1,215 | 1,339 | 0,132 | 0,101 | 0,112 | 0,208 | 0,283 | 0,303 | 0,334 | 0,325 |
| | | 0,140 | 0,118 | 0,159 | 0,347 | 0,569 | 0,841 | 1,076 | 1,246 | 0,128 | 0,117 | 0,110 | 0,170 | 0,246 | 0,267 | 0,296 | 0,303 |
| C1A | | 0,144 | 0,104 | 0,157 | 0,337 | 0,577 | 0,924 | 1,186 | 1,335 | 0,140 | 0,117 | 0,137 | 0,168 | 0,160 | 0,180 | 0,191 | 0,195 |
| | | 0,157 | 0,117 | 0,159 | 0,329 | 0,570 | 0,905 | 1,158 | 1,303 | 0,133 | 0,120 | 0,136 | 0,166 | 0,178 | 0,188 | 0,200 | 0,182 |
| C1B | | 0,121 | 0,085 | 0,147 | 0,411 | 0,610 | 0,899 | 1,136 | 1,241 | 0,129 | 0,116 | 0,136 | 0,163 | 0,171 | 0,187 | 0,200 | 0,189 |
| | | 0,149 | 0,148 | 0,219 | 0,478 | 0,637 | 1,000 | 1,285 | 1,343 | 0,116 | 0,108 | 0,116 | 0,144 | 0,144 | 0,169 | 0,195 | 0,176 |
| C1C | | 0,107 | 0,079 | 0,115 | 0,290 | 0,571 | 0,858 | 1,137 | 1,249 | 0,103 | 0,098 | 0,114 | 0,150 | 0,147 | 0,169 | 0,198 | 0,165 |
| | | 0,138 | 0,080 | 0,127 | 0,264 | 0,515 | 0,907 | 1,157 | 1,280 | 0,096 | 0,095 | 0,116 | 0,146 | 0,139 | 0,164 | 0,194 | 0,156 |
| C1D | | 0,135 | 0,103 | 0,145 | 0,357 | 0,600 | 0,919 | 1,167 | 1,392 | 0,134 | 0,110 | 0,130 | 0,164 | 0,169 | 0,190 | 0,230 | 0,187 |
| | | 0,129 | 0,081 | 0,137 | 0,241 | 0,516 | 0,870 | 1,119 | 1,228 | 0,133 | 0,128 | 0,141 | 0,180 | 0,179 | 0,196 | 0,230 | 0,197 |
| C2A | | 0,116 | 0,095 | 0,142 | 0,381 | 0,635 | 0,928 | 1,185 | 1,270 | 0,110 | 0,110 | 0,126 | 0,150 | 0,147 | 0,174 | 0,205 | 0,171 |
| | | 0,113 | 0,097 | 0,128 | 0,239 | 0,503 | 0,871 | 1,196 | 1,354 | 0,086 | 0,088 | 0,099 | 0,126 | 0,126 | 0,145 | 0,170 | 0,144 |
| C2B | | 0,122 | 0,106 | 0,162 | 0,438 | 0,628 | 0,902 | 1,143 | 1,303 | 0,117 | 0,115 | 0,134 | 0,167 | 0,164 | 0,162 | 0,211 | 0,204 |
| | | 0,122 | 0,128 | 0,121 | 0,296 | 0,631 | 0,554 | 1,147 | 1,311 | 0,099 | 0,093 | 0,118 | 0,152 | 0,154 | 0,158 | 0,191 | 0,183 |
| C2C | | 0,140 | 0,102 | 0,153 | 0,434 | 0,644 | 0,900 | 1,294 | 1,445 | 0,100 | 0,096 | 0,128 | 0,159 | 0,162 | 0,177 | 0,195 | 0,181 |
| | | 0,124 | 0,091 | 0,113 | 0,236 | 0,529 | 0,900 | 1,200 | 1,348 | 0,107 | 0,103 | 0,126 | 0,156 | 0,165 | 0,167 | 0,175 | 0,180 |
| C3A | | 0,134 | 0,104 | 0,157 | 0,405 | 0,617 | 0,904 | 1,165 | 1,343 | 0,102 | 0,107 | 0,121 | 0,150 | 0,137 | 0,147 | 0,153 | 0,161 |
| | | 0,118 | 0,103 | 0,129 | 0,337 | 0,609 | 0,815 | 1,100 | 1,271 | 0,121 | 0,130 | 0,129 | 0,169 | 0,169 | 0,171 | 0,175 | 0,181 |
| C3B | | 0,109 | 0,085 | 0,149 | 0,403 | 0,649 | 1,002 | 1,205 | 1,474 | 0,099 | 0,131 | 0,131 | 0,167 | 0,164 | 0,169 | 0,173 | 0,188 |
| | | 0,116 | 0,107 | 0,119 | 0,272 | 0,553 | 0,850 | 1,025 | 1,187 | 0,122 | 0,126 | 0,139 | 0,178 | 0,174 | 0,182 | 0,187 | 0,206 |
| C3C | | 0,117 | 0,104 | 0,156 | 0,404 | 0,694 | 1,010 | 1,331 | 1,529 | 0,119 | 0,142 | 0,147 | 0,175 | 0,169 | 0,175 | 0,189 | 0,215 |
| | | 0,135 | 0,110 | 0,135 | 0,278 | 0,561 | 0,879 | 1,203 | 1,414 | 0,112 | 0,117 | 0,134 | 0,159 | 0,156 | 0,159 | 0,163 | 0,169 |
| C4A | | 0,124 | 0,095 | 0,158 | 0,432 | 0,621 | 0,928 | 1,165 | 1,363 | 0,118 | 0,121 | 0,141 | 0,173 | 0,176 | 0,179 | 0,183 | 0,187 |
| | | 0,126 | 0,096 | 0,132 | 0,268 | 0,644 | 1,006 | 1,325 | 1,549 | 0,104 | 0,108 | 0,126 | 0,159 | 0,153 | 0,163 | 0,169 | 0,178 |
| C4B | | 0,110 | 0,077 | 0,128 | 0,362 | 0,583 | 0,900 | 1,156 | 1,323 | 0,109 | 0,115 | 0,133 | 0,156 | 0,163 | 0,170 | 0,175 | 0,180 |
| | | 0,105 | 0,077 | 0,091 | 0,214 | 0,521 | 1,002 | 1,402 | 1,633 | 0,123 | 0,138 | 0,138 | 0,166 | 0,159 | 0,175 | 0,183 | 0,194 |
| C5A | | 0,109 | 0,085 | 0,137 | 0,408 | 0,630 | 0,980 | 1,200 | 1,368 | 0,110 | 0,115 | 0,181 | 0,217 | 0,205 | 0,212 | 0,215 | 0,222 |
| | | 0,129 | 0,093 | 0,119 | 0,244 | 0,551 | 1,000 | 1,212 | 1,398 | 0,100 | 0,095 | 0,164 | 0,209 | 0,192 | 0,200 | 0,202 | 0,206 |
| C5C | | 0,112 | 0,087 | 0,159 | 0,339 | 0,658 | 0,989 | 1,222 | 1,441 | 0,113 | 0,125 | 0,141 | 0,170 | 0,167 | 0,173 | 0,180 | 0,189 |
| | | 0,120 | 0,094 | 0,120 | 0,256 | 0,563 | 0,900 | 1,200 | 1,453 | 0,107 | 0,119 | 0,135 | 0,157 | 0,159 | 0,165 | 0,169 | 0,180 |
| C5D | | 0,128 | 0,101 | 0,155 | 0,441 | 0,680 | 0,980 | 1,200 | 1,375 | 0,103 | 0,115 | 0,114 | 0,149 | 0,149 | 0,156 | 0,163 | 0,176 |
| | | 0,131 | 0,098 | 0,101 | 0,231 | 0,538 | 1,000 | 1,250 | 1,463 | 0,120 | 0,129 | 0,139 | 0,167 | 0,163 | 0,175 | 0,180 | 0,191 |
| C5E | | 0,177 | 0,174 | 0,307 | 0,662 | 0,854 | 1,200 | 1,425 | 1,616 | 0,172 | 0,151 | 0,235 | 0,278 | 0,274 | 0,310 | 0,325 | 0,337 |
| | | 0,273 | 0,311 | 0,377 | 0,652 | 1,180 | 1,525 | 2,000 | 2,447 | 0,174 | 0,143 | 0,239 | 0,272 | 0,271 | 0,300 | 0,312 | 0,310 |
| C5F | | 0,193 | 0,163 | 0,279 | 0,705 | 0,981 | 1,250 | 1,499 | 1,711 | 0,176 | 0,200 | 0,237 | 0,293 | 0,299 | 0,330 | 0,351 | 0,371 |
| | | 0,198 | 0,168 | 0,284 | 0,710 | 0,986 | 1,255 | 1,504 | 1,716 | 0,179 | 0,203 | 0,240 | 0,296 | 0,302 | 0,333 | 0,354 | 0,374 |

Tabla A X.26. Porcentajes de inhibición. Ensayo CON adición de medio nutriente (*T. chuii* - B. Cádiz)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|---------|--------|--------|--------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| C1A | 8,11 | -72,41 | -36,46 | -13,67 | -2,80 | 3,23 | 3,63 |
| C1B | -48,65 | 65,52 | 7,64 | -0,20 | 3,69 | 8,69 | 2,57 |
| C1C | 16,22 | -106,90 | -46,18 | -14,08 | -3,31 | 3,54 | 1,24 |
| C1D | 8,11 | -68,97 | -42,01 | -13,06 | -2,93 | 2,12 | 4,43 |
| C2A | -48,65 | -27,59 | -31,94 | -7,14 | -0,13 | 8,69 | 6,21 |
| C2B | -86,49 | -31,03 | -14,93 | 3,67 | -22,90 | 3,33 | 5,05 |
| C2C | -2,70 | -96,55 | -29,51 | -7,14 | -2,29 | 12,63 | 12,15 |
| C3A | -37,84 | -41,38 | -14,93 | -0,61 | -6,62 | 1,72 | 4,70 |
| C3B | -54,05 | -24,14 | -21,88 | -0,20 | 3,56 | 1,31 | 7,98 |
| C3C | -48,65 | -31,03 | -25,35 | 2,45 | 4,20 | 15,25 | 19,33 |
| C4A | -18,92 | -31,03 | -21,88 | 3,67 | 7,12 | 13,13 | 18,00 |
| C4B | -16,22 | -93,10 | -37,15 | -9,18 | 7,38 | 18,38 | 21,54 |
| C5A | -18,92 | -68,97 | -28,13 | -3,67 | 10,81 | 9,80 | 12,06 |
| C5C | -29,73 | -17,24 | -36,81 | 1,02 | 5,47 | 10,61 | 18,00 |
| C5D | -18,92 | -106,90 | -28,13 | -2,04 | 9,54 | 10,71 | 14,36 |
| C5E | -148,65 | 303,45 | 50,00 | 61,63 | 44,78 | 50,30 | 60,20 |
| C5F | -18,92 | 196,55 | 77,78 | 60,82 | 34,48 | 31,92 | 34,57 |

Tabla A X.27. Porcentajes de inhibición. Ensayo SIN adición de medio nutriente (*T. chuii* - B. Cádiz)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| C1A | -30,77 | -100,00 | -60,76 | -76,60 | -70,55 | -67,04 | -70,45 |
| C1B | -57,69 | -130,77 | -60,76 | -75,18 | -65,64 | -58,10 | -65,91 |
| C1C | -88,46 | -223,08 | -37,97 | -68,79 | -58,90 | -45,81 | -65,34 |
| C1D | -42,31 | -115,38 | -50,63 | -70,92 | -63,19 | -45,81 | -66,48 |
| C2A | -103,85 | -215,38 | -49,37 | -72,34 | -61,96 | -49,72 | -65,91 |
| C2B | -84,62 | -238,46 | -34,18 | -63,83 | -68,10 | -48,04 | -51,14 |
| C2C | -84,62 | -284,62 | -31,65 | -57,45 | -57,67 | -54,19 | -56,25 |
| C3A | -126,92 | -207,69 | -39,24 | -70,21 | -70,55 | -70,39 | -65,91 |
| C3B | -169,23 | -292,31 | -21,52 | -58,16 | -60,12 | -60,89 | -50,57 |
| C3C | -153,85 | -292,31 | -34,18 | -66,67 | -68,10 | -65,92 | -56,25 |
| C4A | -115,38 | -276,92 | -30,38 | -61,70 | -63,19 | -63,69 | -59,09 |
| C4B | -142,31 | -253,85 | -43,04 | -68,09 | -65,03 | -64,80 | -59,66 |
| C5A | -100,00 | -623,08 | 36,71 | -33,33 | -38,04 | -41,90 | -38,07 |
| C5C | -146,15 | -315,38 | -31,65 | -62,41 | -63,80 | -63,69 | -57,39 |
| C5D | -142,31 | -215,38 | -40,51 | -68,09 | -66,87 | -66,48 | -59,09 |
| C5E | 0,00 | -592,31 | 29,11 | -29,08 | -19,02 | -18,44 | -14,20 |
| C5F | -192,31 | -569,23 | 48,10 | -12,77 | -5,52 | -2,23 | 10,80 |

Tabla A X.28. Índice de eutrofización $-I_E-$ (*T. chuii* - B. Cádiz)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| Control | 0,703 | -0,448 | 0,274 | 0,288 | 0,207 | 0,181 | 0,156 |
| C1A | 0,450 | 0,000 | 0,169 | 0,078 | 0,063 | 0,058 | 0,044 |
| C1B | 0,579 | 0,083 | 0,100 | 0,072 | 0,069 | 0,070 | 0,052 |
| C1C | 0,070 | -8,000 | 0,316 | 0,105 | 0,088 | 0,095 | 0,053 |
| C1D | 0,375 | 0,222 | 0,234 | 0,096 | 0,079 | 0,096 | 0,050 |
| C2A | -0,053 | 0,714 | 0,204 | 0,086 | 0,079 | 0,084 | 0,050 |
| C2B | 0,800 | 0,900 | 0,212 | 0,100 | 0,086 | 0,091 | 0,073 |
| C2C | 0,111 | 24,000 | 0,266 | 0,132 | 0,090 | 0,074 | 0,061 |
| C3A | -0,304 | 0,824 | 0,196 | 0,086 | 0,065 | 0,053 | 0,051 |
| C3B | -1,059 | 1,136 | 0,276 | 0,121 | 0,080 | 0,070 | 0,071 |
| C3C | -0,737 | 1,250 | 0,242 | 0,094 | 0,063 | 0,053 | 0,057 |
| C4A | -0,133 | 1,150 | 0,244 | 0,106 | 0,071 | 0,058 | 0,054 |
| C4B | -0,355 | 10,000 | 0,249 | 0,101 | 0,068 | 0,054 | 0,052 |
| C5A | 0,000 | 7,556 | 0,522 | 0,199 | 0,116 | 0,096 | 0,086 |
| C5C | -0,462 | 1,167 | 0,297 | 0,107 | 0,071 | 0,059 | 0,056 |
| C5D | -0,367 | -7,500 | 0,227 | 0,094 | 0,063 | 0,055 | 0,056 |
| C5E | -1,444 | 0,547 | 0,236 | 0,126 | 0,116 | 0,098 | 0,084 |
| C5F | -0,800 | 0,709 | 0,229 | 0,156 | 0,146 | 0,134 | 0,128 |

2.2.4 *Thalassiosira pseudonana*

Tabla A X.29.

Evolución de la biomasa de *Thalassiosira pseudonana*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| | | <i>T. pseudonana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | |
|---------|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|
| | | Ensayo <u>CON</u> adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 8 | 10 | |
| | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 | |
| Control | | 0,065 | 0,078 | 0,076 | 0,119 | 0,173 | 0,398 | 0,614 | 0,727 | |
| | | 0,065 | 0,072 | 0,072 | 0,112 | 0,150 | 0,356 | 0,570 | 0,708 | |
| | | 0,069 | 0,080 | 0,082 | 0,121 | 0,162 | 0,333 | 0,551 | 0,671 | |
| | | 0,087 | 0,100 | 0,098 | 0,136 | 0,192 | 0,376 | 0,538 | 0,676 | |
| C1A | | 0,100 | 0,115 | 0,127 | 0,146 | 0,175 | 0,360 | 0,541 | 0,656 | |
| | | 0,093 | 0,096 | 0,100 | 0,131 | 0,155 | 0,306 | 0,529 | 0,640 | |
| C1B | | 0,071 | 0,086 | 0,081 | 0,101 | 0,124 | 0,272 | 0,505 | 0,541 | |
| | | 0,073 | 0,097 | 0,083 | 0,114 | 0,136 | 0,284 | 0,493 | 0,605 | |
| C1C | | 0,072 | 0,074 | 0,082 | 0,114 | 0,149 | 0,294 | 0,451 | 0,630 | |
| | | 0,074 | 0,068 | 0,068 | 0,098 | 0,110 | 0,260 | 0,468 | 0,578 | |
| C1D | | 0,073 | 0,085 | 0,083 | 0,109 | 0,136 | 0,316 | 0,555 | 0,719 | |
| | | 0,078 | 0,094 | 0,079 | 0,123 | 0,156 | 0,338 | 0,565 | 0,704 | |
| C2A | | 0,056 | 0,066 | 0,066 | 0,107 | 0,124 | 0,323 | 0,526 | 0,665 | |
| | | 0,069 | 0,081 | 0,085 | 0,129 | 0,146 | 0,349 | 0,569 | 0,747 | |
| C2B | | 0,085 | 0,094 | 0,095 | 0,127 | 0,156 | 0,314 | 0,562 | 0,732 | |
| | | 0,075 | 0,087 | 0,093 | 0,125 | 0,144 | 0,334 | 0,563 | 0,628 | |
| C2C | | 0,092 | 0,094 | 0,078 | 0,133 | 0,168 | 0,359 | 0,493 | 0,483 | |
| | | 0,069 | 0,080 | 0,079 | 0,115 | 0,137 | 0,313 | 0,532 | 0,560 | |
| C3A | | 0,091 | 0,099 | 0,100 | 0,124 | 0,160 | 0,380 | 0,577 | 0,604 | |
| | | 0,086 | 0,099 | 0,102 | 0,138 | 0,172 | 0,361 | 0,558 | 0,644 | |
| C3B | | 0,076 | 0,100 | 0,083 | 0,127 | 0,162 | 0,339 | 0,592 | 0,677 | |
| | | 0,086 | 0,105 | 0,095 | 0,126 | 0,151 | 0,345 | 0,551 | 0,622 | |
| C3C | | 0,079 | 0,086 | 0,081 | 0,128 | 0,144 | 0,327 | 0,575 | 0,714 | |
| | | 0,068 | 0,076 | 0,070 | 0,113 | 0,137 | 0,323 | 0,579 | 0,755 | |
| C4A | | 0,088 | 0,100 | 0,089 | 0,131 | 0,165 | 0,362 | 0,598 | 0,729 | |
| | | 0,068 | 0,079 | 0,076 | 0,110 | 0,139 | 0,315 | 0,490 | 0,608 | |
| C4B | | 0,097 | 0,110 | 0,096 | 0,126 | 0,174 | 0,341 | 0,580 | 0,743 | |
| | | 0,070 | 0,081 | 0,072 | 0,103 | 0,129 | 0,282 | 0,517 | 0,651 | |
| C5A | | 0,148 | 0,137 | 0,130 | 0,179 | 0,233 | 0,489 | 0,800 | 0,962 | |
| | | 0,125 | 0,115 | 0,110 | 0,156 | 0,212 | 0,478 | 0,756 | 0,882 | |
| C5C | | 0,087 | 0,093 | 0,093 | 0,124 | 0,150 | 0,314 | 0,556 | 0,727 | |
| | | 0,066 | 0,075 | 0,073 | 0,104 | 0,132 | 0,306 | 0,533 | 0,668 | |
| C5D | | 0,110 | 0,074 | 0,068 | 0,102 | 0,126 | 0,283 | 0,538 | 0,650 | |
| | | 0,084 | 0,103 | 0,094 | 0,116 | 0,144 | 0,284 | 0,515 | 0,673 | |
| C5E | | 0,094 | 0,104 | 0,099 | 0,142 | 0,195 | 0,393 | 0,621 | 0,641 | |
| | | 0,086 | 0,100 | 0,098 | 0,139 | 0,195 | 0,410 | 0,580 | 0,607 | |
| C5F | | 0,125 | 0,139 | 0,139 | 0,199 | 0,247 | 0,534 | 0,824 | 0,908 | |
| | | 0,217 | 0,215 | 0,247 | 0,366 | 0,489 | 0,819 | 1,131 | 1,216 | |

Tabla A X.30. Porcentajes de inhibición. Ensayo CON adición de medio nutriente (*T. pseudonana* - B. Cádiz)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| C1A | -18,18 | 54,55 | -17,65 | -29,59 | -19,39 | -11,67 | -11,54 |
| C1B | 81,82 | -9,09 | -29,41 | -40,82 | -29,93 | -14,08 | -19,71 |
| C1C | -118,18 | -81,82 | -35,29 | -41,84 | -30,61 | -22,13 | -14,90 |
| C1D | 27,27 | -45,45 | -19,61 | -27,55 | -14,29 | -2,41 | 1,92 |
| C2A | 0,00 | 18,18 | 9,80 | -25,51 | -6,80 | -2,41 | 3,21 |
| C2B | 0,00 | 27,27 | -9,80 | -28,57 | -17,01 | -2,82 | -3,85 |
| C2C | -36,36 | -118,18 | -13,73 | -26,53 | -12,93 | -13,08 | -29,33 |
| C3A | 0,00 | 18,18 | -15,69 | -20,41 | -4,08 | -3,62 | -14,10 |
| C3B | 100,00 | -27,27 | -9,80 | -22,45 | -11,22 | -1,21 | -8,81 |
| C3C | -36,36 | -81,82 | -7,84 | -31,63 | -14,29 | 1,41 | 5,93 |
| C4A | 9,09 | -54,55 | -15,69 | -24,49 | -11,22 | -6,24 | -5,29 |
| C4B | 9,09 | -100,00 | -39,22 | -30,61 | -22,45 | -6,44 | -1,60 |
| C5A | -200,00 | -254,55 | -39,22 | -12,24 | 18,03 | 29,18 | 25,96 |
| C5C | -27,27 | -36,36 | -25,49 | -33,67 | -20,41 | -5,84 | -0,48 |
| C5D | -181,82 | -245,45 | -76,47 | -61,22 | -36,39 | -13,48 | -9,46 |
| C5E | 9,09 | -18,18 | 0,00 | 7,14 | 6,12 | 2,82 | -14,42 |
| C5F | -45,45 | 100,00 | 119,61 | 101,02 | 72,11 | 62,37 | 42,79 |

Tabla A X.31. Porcentajes de inhibición. Ensayo SIN adición de medio nutriente (*T. pseudonana* - B. Cádiz)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|---------|---------|---------|----------|---------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| C1A | 28,57 | -115,63 | -185,71 | -253,57 | -1642,86 | 1491,67 | 860,00 |
| C1B | 157,14 | -103,13 | -182,14 | -214,29 | -1328,57 | 991,67 | 390,00 |
| C1C | 42,86 | -96,88 | -182,14 | -121,43 | -371,43 | 300,00 | -5,00 |
| C1D | 42,86 | -103,13 | -160,71 | -160,71 | -1228,57 | 466,67 | 95,00 |
| C2A | 28,57 | -118,75 | -228,57 | -228,57 | -957,14 | 658,33 | 270,00 |
| C2B | 100,00 | -140,63 | -235,71 | -325,00 | -2085,71 | 1366,67 | 635,00 |
| C2C | 42,86 | -112,50 | -164,29 | -164,29 | -642,86 | 383,33 | 70,00 |
| C3A | 100,00 | -156,25 | -228,57 | -257,14 | -1557,14 | 1016,67 | 395,00 |
| C3B | 128,57 | -84,38 | -242,86 | -289,29 | -1485,71 | 1016,67 | 360,00 |
| C3C | 57,14 | -125,00 | -221,43 | -264,29 | -1528,57 | 1233,33 | 490,00 |
| C4A | 71,43 | -106,25 | -200,00 | -264,29 | -1600,00 | 1133,33 | 425,00 |
| C4B | 42,86 | -81,25 | -153,57 | -132,14 | -342,86 | 300,00 | -35,00 |
| C5A | -28,57 | -84,38 | -221,43 | -596,43 | -1942,86 | 1450,00 | 765,00 |
| C5C | 57,14 | -106,25 | -185,71 | -150,00 | -542,86 | 458,33 | 65,00 |
| C5D | -214,29 | -37,50 | -103,57 | -64,29 | -85,71 | 183,33 | 0,00 |
| C5E | -214,29 | -65,63 | -192,86 | -242,86 | -1342,86 | 833,33 | 170,00 |
| C5F | 14,29 | -118,75 | -228,57 | -292,86 | -2042,86 | 1466,67 | 475,00 |

Tabla A X.32. Índice de eutrofización $-I_E-$ (*T. pseudonana* - B. Cádiz)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 192 | 240 |
| Control | 0,636 | -2,909 | -0,549 | -0,286 | -0,024 | 0,024 | 0,032 |
| C1A | 1,000 | 0,294 | 0,571 | 0,623 | 0,456 | 0,435 | 0,348 |
| C1B | 0,900 | 0,100 | 0,639 | 0,552 | 0,417 | 0,307 | 0,196 |
| C1C | -5,000 | -0,500 | 0,697 | 0,105 | 0,093 | 0,124 | 0,036 |
| C1D | 0,714 | 0,167 | 0,415 | 0,239 | 0,313 | 0,140 | 0,061 |
| C2A | 0,818 | 0,462 | 0,643 | 0,493 | 0,219 | 0,188 | 0,115 |
| C2B | 1,273 | 0,929 | 0,826 | 0,900 | 0,570 | 0,364 | 0,245 |
| C2C | 1,429 | -2,000 | 0,409 | 0,250 | 0,148 | 0,134 | 0,077 |
| C3A | 1,273 | 1,385 | 0,837 | 0,564 | 0,362 | 0,280 | 0,185 |
| C3B | 0,727 | -0,625 | 0,870 | 0,697 | 0,372 | 0,273 | 0,162 |
| C3C | 1,571 | 4,000 | 0,723 | 0,687 | 0,397 | 0,317 | 0,179 |
| C4A | 1,000 | 0,400 | 0,651 | 0,622 | 0,402 | 0,318 | 0,178 |
| C4B | 0,833 | (*) | 0,484 | 0,132 | 0,075 | 0,103 | 0,021 |
| C5A | -0,455 | 0,294 | 1,097 | 1,616 | 0,372 | 0,290 | 0,220 |
| C5C | 1,375 | 0,286 | 0,632 | 0,215 | 0,132 | 0,143 | 0,053 |
| C5D | 0,889 | 1,250 | 0,083 | -0,263 | -0,005 | 0,079 | 0,035 |
| C5E | -0,667 | -1,222 | 0,510 | 0,381 | 0,279 | 0,219 | 0,101 |
| C5F | 1,333 | 0,273 | 0,321 | 0,274 | 0,269 | 0,233 | 0,129 |

(*) División por cero

2.3. RÍO IRO

2.3.1. *Nannochloropsis gaditana*

Tabla A X.33.

Evolución de la biomasa de *Nannochloropsis gaditana*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| <i>N. gaditana</i>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|
| Ensayo CON adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | | Ensayo SIN adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | |
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 10 | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 10 |
| | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| Control | 0,217 | 0,325 | 0,482 | 0,757 | 1,084 | 1,385 | 1,654 | 0,202 | 0,323 | 0,462 | 0,573 | 0,646 | 0,624 | 0,688 | |
| | 0,225 | 0,310 | 0,451 | 0,655 | 0,961 | 1,284 | 1,564 | 0,210 | 0,317 | 0,444 | 0,498 | 0,574 | 0,574 | 0,659 | |
| | 0,217 | 0,293 | 0,440 | 0,648 | 0,956 | 1,290 | 1,515 | 0,202 | 0,293 | 0,434 | 0,511 | 0,566 | 0,571 | 0,639 | |
| | 0,212 | 0,287 | 0,432 | 0,633 | 0,890 | 1,213 | 1,478 | 0,198 | 0,281 | 0,426 | 0,508 | 0,523 | 0,547 | 0,627 | |
| I2 | 0,238 | 0,333 | 0,461 | 0,640 | 0,911 | 1,209 | 1,546 | 0,233 | 0,363 | 0,470 | 0,577 | 0,667 | 0,835 | 1,037 | |
| | 0,229 | 0,317 | 0,453 | 0,604 | 0,859 | 1,147 | 1,500 | 0,237 | 0,336 | 0,445 | 0,528 | 0,615 | 0,793 | 1,025 | |
| I3 | 0,216 | 0,330 | 0,533 | 0,791 | 1,040 | 1,255 | 1,533 | 0,216 | 0,343 | 0,528 | 0,752 | 0,774 | 0,952 | 1,322 | |
| | 0,208 | 0,312 | 0,505 | 0,734 | 1,023 | 1,279 | 1,558 | 0,215 | 0,342 | 0,523 | 0,742 | 0,778 | 0,934 | 1,306 | |
| I4 | 0,214 | 0,303 | 0,445 | 0,665 | 0,929 | 1,157 | 1,405 | 0,202 | 0,340 | 0,440 | 0,540 | 0,623 | 0,778 | 0,942 | |
| | 0,228 | 0,319 | 0,442 | 0,649 | 0,909 | 1,185 | 1,480 | 0,229 | 0,337 | 0,435 | 0,504 | 0,592 | 0,755 | 0,939 | |
| I5 | 0,231 | 0,329 | 0,451 | 0,646 | 0,929 | 1,211 | 1,515 | 0,230 | 0,369 | 0,471 | 0,574 | 0,664 | 0,808 | 0,994 | |
| | 0,237 | 0,325 | 0,442 | 0,619 | 0,899 | 1,193 | 1,513 | 0,211 | 0,325 | 0,410 | 0,509 | 0,585 | 0,747 | 0,938 | |
| I6 | 0,225 | 0,315 | 0,431 | 0,602 | 0,864 | 1,190 | 1,511 | 0,203 | 0,344 | 0,450 | 0,538 | 0,627 | 0,757 | 0,919 | |
| | 0,216 | 0,301 | 0,420 | 0,591 | 0,852 | 1,166 | 1,483 | 0,218 | 0,325 | 0,423 | 0,491 | 0,570 | 0,709 | 0,895 | |
| I7 | 0,217 | 0,317 | 0,444 | 0,622 | 0,901 | 1,217 | 1,544 | 0,207 | 0,350 | 0,451 | 0,545 | 0,632 | 0,779 | 0,954 | |
| | 0,231 | 0,324 | 0,439 | 0,602 | 0,842 | 1,195 | 1,543 | 0,228 | 0,342 | 0,306 | 0,507 | 0,595 | 0,751 | 0,940 | |
| I8 | 0,212 | 0,304 | 0,419 | 0,591 | 0,867 | 1,150 | 1,415 | 0,236 | 0,321 | 0,407 | 0,453 | 0,505 | 0,626 | 0,767 | |
| | 0,236 | 0,305 | 0,419 | 0,576 | 0,820 | 1,124 | 1,436 | 0,215 | 0,304 | 0,389 | 0,422 | 0,482 | 0,602 | 0,758 | |

Tabla A X.34. Porcentajes de inhibición. Ensayo CON adición de medio nutriente (*N. gaditana*–R. Iro)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| I2 | 6,71 | -4,39 | -14,51 | -13,68 | -12,16 | -3,41 |
| I3 | 26,53 | 31,55 | 20,99 | 8,58 | -1,93 | -0,07 |
| I4 | 4,96 | -4,81 | -4,29 | -7,52 | -11,65 | -8,50 |
| I5 | 7,87 | -9,09 | -12,53 | -9,97 | -9,97 | -4,19 |
| I6 | 2,04 | -12,30 | -17,36 | -15,53 | -10,95 | -4,38 |
| I7 | 12,54 | -6,95 | -14,73 | -14,21 | -8,67 | -1,16 |
| I8 | -6,12 | -16,58 | -20,99 | -17,99 | -15,09 | -9,96 |

Tabla A X.35. Porcentajes de inhibición. Ensayo SIN adición de medio nutriente (*N. gaditana*–R. Iro)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| I2 | 1,172 | 1,020 | 0,702 | 0,496 | 0,350 | 0,337 |
| I3 | 1,251 | 0,998 | 0,817 | 0,624 | 0,612 | 0,617 |
| I4 | 1,166 | 1,007 | 0,965 | 0,684 | 0,689 | 0,823 |
| I5 | 1,367 | 0,998 | 0,704 | 0,561 | 0,580 | 0,593 |
| I6 | 1,368 | 1,035 | 0,807 | 0,595 | 0,575 | 0,583 |
| I7 | 1,423 | 1,105 | 0,810 | 0,609 | 0,546 | 0,545 |
| I8 | 1,337 | 0,743 | 0,795 | 0,613 | 0,558 | 0,553 |

Tabla A X.36. Índice de eutrofización –I_E– (*N. gaditana*–R. Iro)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| I2 | 1,251 | 0,998 | 0,817 | 0,624 | 0,612 | 0,617 |
| I3 | 1,166 | 1,007 | 0,965 | 0,684 | 0,689 | 0,823 |
| I4 | 1,367 | 0,998 | 0,704 | 0,561 | 0,580 | 0,593 |
| I5 | 1,368 | 1,035 | 0,807 | 0,595 | 0,575 | 0,583 |
| I6 | 1,423 | 1,105 | 0,810 | 0,609 | 0,546 | 0,545 |
| I7 | 1,337 | 0,743 | 0,795 | 0,613 | 0,558 | 0,553 |
| I8 | 1,087 | 0,887 | 0,592 | 0,433 | 0,426 | 0,448 |

2.3.2. *Isochrysis galbana*

Tabla A X.37.
Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| | | <i>I. galbana</i>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|--|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Ensayo CON adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | Ensayo SIN adición de medio nutriente f/2 | | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 10 |
| | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| Control | | 0,227 | 0,345 | 0,517 | 0,652 | 0,767 | 0,993 | 1,173 | 0,247 | 0,260 | 0,397 | 0,383 | 0,364 | 0,302 | 0,264 |
| | | 0,197 | 0,309 | 0,486 | 0,626 | 0,743 | 0,979 | 1,170 | 0,214 | 0,234 | 0,375 | 0,371 | 0,353 | 0,298 | 0,265 |
| | | 0,225 | 0,323 | 0,485 | 0,613 | 0,730 | 0,985 | 1,175 | 0,244 | 0,243 | 0,373 | 0,362 | 0,346 | 0,301 | 0,265 |
| | | 0,219 | 0,295 | 0,450 | 0,587 | 0,702 | 0,978 | 1,213 | 0,238 | 0,224 | 0,349 | 0,346 | 0,334 | 0,297 | 0,274 |
| I2 | | 0,220 | 0,290 | 0,452 | 0,608 | 0,761 | 1,053 | 1,395 | 0,222 | 0,320 | 0,448 | 0,510 | 0,551 | 0,596 | 0,557 |
| | | 0,220 | 0,293 | 0,441 | 0,586 | 0,734 | 1,034 | 1,370 | 0,197 | 0,282 | 0,406 | 0,477 | 0,515 | 0,574 | 0,588 |
| I3 | | 0,218 | 0,284 | 0,439 | 0,602 | 0,757 | 1,049 | 1,425 | 0,197 | 0,296 | 0,457 | 0,628 | 0,767 | 0,911 | 1,013 |
| | | 0,211 | 0,277 | 0,419 | 0,563 | 0,718 | 1,025 | 1,400 | 0,216 | 0,305 | 0,435 | 0,585 | 0,732 | 0,888 | 1,013 |
| I4 | | 0,205 | 0,282 | 0,463 | 0,557 | 0,717 | 1,002 | 1,381 | 0,199 | 0,303 | 0,377 | 0,403 | 0,419 | 0,431 | 0,371 |
| | | 0,194 | 0,269 | 0,423 | 0,532 | 0,670 | 0,944 | 1,336 | 0,204 | 0,299 | 0,387 | 0,418 | 0,437 | 0,466 | 0,422 |
| I5 | | 0,218 | 0,295 | 0,443 | 0,608 | 0,743 | 1,009 | 1,298 | 0,213 | 0,322 | 0,393 | 0,455 | 0,485 | 0,512 | 0,519 |
| | | 0,191 | 0,274 | 0,420 | 0,565 | 0,706 | 0,966 | 1,280 | 0,195 | 0,295 | 0,390 | 0,436 | 0,468 | 0,512 | 0,504 |
| I6 | | 0,194 | 0,273 | 0,439 | 0,599 | 0,739 | 0,991 | 1,246 | 0,184 | 0,291 | 0,388 | 0,431 | 0,460 | 0,492 | 0,482 |
| | | 0,190 | 0,270 | 0,414 | 0,559 | 0,717 | 0,998 | 1,345 | 0,192 | 0,277 | 0,387 | 0,441 | 0,469 | 0,504 | 0,352 |
| I7 | | 0,216 | 0,289 | 0,472 | 0,633 | 0,771 | 1,039 | 1,372 | 0,207 | 0,313 | 0,418 | 0,459 | 0,491 | 0,539 | 0,542 |
| | | 0,205 | 0,274 | 0,450 | 0,610 | 0,764 | 1,045 | 1,394 | 0,191 | 0,272 | 0,381 | 0,441 | 0,467 | 0,518 | 0,485 |
| I8 | | 0,218 | 0,288 | 0,467 | 0,629 | 0,765 | 1,018 | 1,313 | 0,199 | 0,274 | 0,324 | 0,355 | 0,372 | 0,395 | 0,387 |
| | | 0,195 | 0,260 | 0,432 | 0,587 | 0,723 | 0,962 | 1,251 | 0,194 | 0,261 | 0,313 | 0,347 | 0,359 | 0,380 | 0,291 |

Tabla A X.38. Porcentajes de inhibición. Ensayo **CON** adición de medio nutriente (*I. galbana* – R. Iro)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|-------|------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| I2 | -29,38 | -15,22 | -6,39 | 1,69 | 7,47 | 20,37 |
| I3 | -35,31 | -19,89 | -8,63 | 0,82 | 7,21 | 24,00 |
| I4 | -24,94 | -9,06 | -14,34 | -4,87 | 0,88 | 19,96 |
| I5 | -20,49 | -15,22 | -5,15 | 0,34 | 2,12 | 12,35 |
| I6 | -21,48 | -12,23 | -3,91 | 3,42 | 4,73 | 14,26 |
| I7 | -29,38 | -6,44 | 2,17 | 7,47 | 8,51 | 21,46 |
| I8 | -33,33 | -9,24 | -0,31 | 3,61 | 2,18 | 11,36 |

Tabla A X.39. Porcentajes de inhibición. Ensayo **SIN** adición de medio nutriente (*I. galbana* – R. Iro)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| I2 | 0,042 | 0,514 | 0,321 | 0,219 | 0,083 | 0,032 |
| I3 | 1,280 | 0,956 | 0,752 | 0,612 | 0,456 | 0,312 |
| I4 | 1,435 | 1,117 | 1,086 | 1,037 | 0,842 | 0,673 |
| I5 | 1,309 | 0,741 | 0,604 | 0,460 | 0,319 | 0,168 |
| I6 | 1,298 | 0,826 | 0,632 | 0,524 | 0,393 | 0,283 |
| I7 | 1,214 | 0,849 | 0,641 | 0,516 | 0,386 | 0,208 |
| I8 | 1,308 | 0,800 | 0,610 | 0,501 | 0,396 | 0,268 |

Tabla A X.40. Índice de eutrofización $-I_E-$ (*I. galbana* – R. Iro)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| I2 | 1,280 | 0,956 | 0,752 | 0,612 | 0,456 | 0,312 |
| I3 | 1,435 | 1,117 | 1,086 | 1,037 | 0,842 | 0,673 |
| I4 | 1,309 | 0,741 | 0,604 | 0,460 | 0,319 | 0,168 |
| I5 | 1,298 | 0,826 | 0,632 | 0,524 | 0,393 | 0,283 |
| I6 | 1,214 | 0,849 | 0,641 | 0,516 | 0,386 | 0,208 |
| I7 | 1,308 | 0,800 | 0,610 | 0,501 | 0,396 | 0,268 |
| I8 | 1,052 | 0,502 | 0,385 | 0,314 | 0,244 | 0,132 |

2.3.3. *Tetraselmis chuii*

Tabla A X.41.
Evolución de la biomasa de *Tetraselmis chuii*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| | | <i>T. chuii</i>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Ensayo CON adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | Ensayo SIN adición de medio nutriente f/2 | | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 10 |
| | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| Control | | 0,169 | 0,283 | 0,568 | 0,814 | 0,955 | 1,199 | 1,524 | 0,174 | 0,276 | 0,292 | 0,308 | 0,260 | 0,220 | 0,205 |
| | | 0,162 | 0,224 | 0,457 | 0,720 | 0,846 | 1,094 | 1,399 | 0,167 | 0,218 | 0,235 | 0,270 | 0,231 | 0,200 | 0,188 |
| | | 0,176 | 0,240 | 0,411 | 0,719 | 0,900 | 1,154 | 1,542 | 0,181 | 0,234 | 0,211 | 0,268 | 0,245 | 0,211 | 0,207 |
| | | 0,176 | 0,239 | 0,354 | 0,645 | 0,845 | 1,085 | 1,466 | 0,180 | 0,232 | 0,180 | 0,242 | 0,229 | 0,199 | 0,197 |
| I2 | | 0,133 | 0,138 | 0,230 | 0,540 | 0,727 | 0,945 | 1,273 | 0,145 | 0,204 | 0,325 | 0,414 | 0,450 | 0,487 | 0,501 |
| | | 0,155 | 0,172 | 0,247 | 0,444 | 0,755 | 1,009 | 1,366 | 0,169 | 0,204 | 0,319 | 0,411 | 0,444 | 0,502 | 0,500 |
| I3 | | 0,160 | 0,171 | 0,286 | 0,556 | 0,815 | 1,060 | 1,414 | 0,135 | 0,188 | 0,338 | 0,551 | 0,616 | 0,695 | 0,807 |
| | | 0,151 | 0,174 | 0,257 | 0,512 | 0,790 | 1,000 | 1,374 | 0,149 | 0,193 | 0,333 | 0,524 | 0,642 | 0,718 | 0,792 |
| I4 | | 0,159 | 0,204 | 0,368 | 0,606 | 0,758 | 0,933 | 1,250 | 0,159 | 0,246 | 0,331 | 0,395 | 0,437 | 0,474 | 0,469 |
| | | 0,169 | 0,187 | 0,276 | 0,511 | 0,680 | 0,887 | 1,242 | 0,163 | 0,216 | 0,302 | 0,372 | 0,415 | 0,461 | 0,443 |
| I5 | | 0,137 | 0,134 | 0,260 | 0,542 | 0,700 | 0,891 | 1,231 | 0,147 | 0,216 | 0,307 | 0,397 | 0,416 | 0,466 | 0,464 |
| | | 0,181 | 0,207 | 0,275 | 0,546 | 0,726 | 0,897 | 1,249 | 0,148 | 0,194 | 0,291 | 0,366 | 0,411 | 0,433 | 0,421 |
| I6 | | 0,151 | 0,157 | 0,277 | 0,604 | 0,764 | 0,991 | 1,385 | 0,156 | 0,180 | 0,318 | 0,383 | 0,414 | 0,464 | 0,456 |
| | | 0,155 | 0,165 | 0,239 | 0,430 | 0,664 | 0,927 | 1,250 | 0,155 | 0,196 | 0,288 | 0,375 | 0,427 | 0,474 | 0,445 |
| I7 | | 0,153 | 0,168 | 0,275 | 0,545 | 0,802 | 1,009 | 1,381 | 0,143 | 0,220 | 0,315 | 0,390 | 0,420 | 0,461 | 0,467 |
| | | 0,146 | 0,169 | 0,242 | 0,466 | 0,798 | 0,987 | 1,412 | 0,151 | 0,194 | 0,287 | 0,373 | 0,420 | 0,480 | 0,466 |
| I8 | | 0,139 | 0,132 | 0,213 | 0,502 | 0,695 | 0,917 | 1,300 | 0,149 | 0,188 | 0,257 | 0,293 | 0,325 | 0,363 | 0,354 |
| | | 0,162 | 0,166 | 0,208 | 0,445 | 0,680 | 0,918 | 1,318 | 0,140 | 0,164 | 0,237 | 0,283 | 0,319 | 0,349 | 0,346 |

Tabla A X.42. Porcentajes de inhibición. Ensayo **CON** adición de medio nutriente (*T. chuii*– R. Iro)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| I2 | -85,53 | -65,70 | -37,00 | -16,62 | -13,50 | -10,37 |
| I3 | -77,63 | -58,12 | -31,59 | -9,64 | -9,14 | -5,56 |
| I4 | -57,89 | -42,96 | -28,88 | -22,49 | -22,53 | -17,53 |
| I5 | -84,21 | -60,65 | -30,51 | -22,63 | -23,68 | -17,61 |
| I6 | -89,47 | -62,09 | -34,30 | -21,65 | -16,30 | -11,28 |
| I7 | -75,00 | -60,29 | -35,74 | -9,08 | -11,84 | -4,95 |
| I8 | -102,63 | -78,34 | -41,70 | -25,00 | -20,35 | -11,74 |

Tabla A X.43. Porcentajes de inhibición. Ensayo **SIN** adición de medio nutriente (*T. chuii*– R. Iro)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|------|------|------|------|------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| I2 | 0,86 | 0,19 | 0,17 | 0,09 | 0,03 | 0,02 |
| I3 | 4,27 | 1,74 | 0,73 | 0,49 | 0,40 | 0,29 |
| I4 | 2,88 | 1,67 | 1,04 | 0,75 | 0,65 | 0,53 |
| I5 | 2,19 | 0,98 | 0,56 | 0,48 | 0,41 | 0,27 |
| I6 | 4,75 | 1,39 | 0,61 | 0,48 | 0,41 | 0,27 |
| I7 | 4,13 | 1,40 | 0,61 | 0,47 | 0,39 | 0,25 |
| I8 | 3,16 | 1,40 | 0,66 | 0,42 | 0,38 | 0,26 |

Tabla A X.44. Índice de eutrofización $-I_E-$ (*T. chuii*– R. Iro)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| I2 | 4,273 | 1,737 | 0,731 | 0,486 | 0,405 | 0,292 |
| I3 | 2,882 | 1,672 | 1,045 | 0,753 | 0,646 | 0,530 |
| I4 | 2,188 | 0,981 | 0,563 | 0,477 | 0,410 | 0,273 |
| I5 | 4,750 | 1,385 | 0,608 | 0,480 | 0,411 | 0,273 |
| I6 | 4,125 | 1,400 | 0,613 | 0,472 | 0,388 | 0,253 |
| I7 | 3,158 | 1,400 | 0,660 | 0,419 | 0,382 | 0,257 |
| I8 | -16,000 | 1,700 | 0,443 | 0,330 | 0,275 | 0,178 |

2.3.4. *Thalassiosira pseudonana*

Tabla A X.45.

Evolución de la biomasa de *Thalassiosira pseudonana*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| | | <i>T. pseudonana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | | | | | |
|----------------|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Ensayo CON adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | Ensayo SIN adición de medio nutriente f/2 | | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 6 | 10 |
| | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| Control | | 0,089 | 0,161 | 0,331 | 0,486 | 0,557 | 0,607 | 0,689 | 0,092 | 0,157 | 0,170 | 0,184 | 0,151 | 0,111 | 0,093 |
| | | 0,120 | 0,188 | 0,345 | 0,496 | 0,588 | 0,637 | 0,760 | 0,123 | 0,183 | 0,177 | 0,186 | 0,161 | 0,116 | 0,102 |
| | | 0,079 | 0,132 | 0,277 | 0,422 | 0,525 | 0,592 | 0,712 | 0,082 | 0,128 | 0,142 | 0,157 | 0,143 | 0,109 | 0,095 |
| | | 0,076 | 0,114 | 0,250 | 0,405 | 0,512 | 0,577 | 0,716 | 0,078 | 0,111 | 0,127 | 0,152 | 0,139 | 0,106 | 0,096 |
| I2 | | 0,107 | 0,156 | 0,323 | 0,434 | 0,530 | 0,698 | 0,829 | 0,076 | 0,152 | 0,303 | 0,347 | 0,356 | 0,350 | 0,274 |
| | | 0,101 | 0,149 | 0,299 | 0,432 | 0,536 | 0,696 | 0,876 | 0,095 | 0,156 | 0,298 | 0,354 | 0,359 | 0,357 | 0,284 |
| I3 | | 0,109 | 0,154 | 0,347 | 0,547 | 0,633 | 0,726 | 0,837 | 0,075 | 0,152 | 0,351 | 0,395 | 0,351 | 0,256 | 0,173 |
| | | 0,104 | 0,149 | 0,329 | 0,556 | 0,634 | 0,783 | 0,874 | 0,095 | 0,160 | 0,326 | 0,348 | 0,269 | 0,195 | 0,172 |
| I4 | | 0,079 | 0,148 | 0,298 | 0,401 | 0,494 | 0,662 | 0,872 | 0,081 | 0,188 | 0,280 | 0,315 | 0,323 | 0,324 | 0,251 |
| | | 0,104 | 0,155 | 0,322 | 0,418 | 0,522 | 0,703 | 0,862 | 0,084 | 0,163 | 0,287 | 0,330 | 0,334 | 0,336 | 0,289 |
| I5 | | 0,090 | 0,161 | 0,339 | 0,451 | 0,535 | 0,691 | 0,897 | 0,065 | 0,179 | 0,289 | 0,324 | 0,326 | 0,331 | 0,285 |
| | | 0,070 | 0,113 | 0,271 | 0,375 | 0,488 | 0,635 | 0,834 | 0,072 | 0,173 | 0,234 | 0,239 | 0,226 | 0,210 | 0,124 |
| I6 | | 0,106 | 0,161 | 0,337 | 0,474 | 0,565 | 0,718 | 0,853 | 0,076 | 0,182 | 0,254 | 0,274 | 0,260 | 0,256 | 0,186 |
| | | 0,079 | 0,129 | 0,301 | 0,434 | 0,526 | 0,674 | 0,814 | 0,079 | 0,167 | 0,276 | 0,299 | 0,292 | 0,298 | 0,226 |
| I7 | | 0,075 | 0,132 | 0,310 | 0,434 | 0,532 | 0,667 | 0,792 | 0,099 | 0,193 | 0,300 | 0,332 | 0,334 | 0,331 | 0,268 |
| | | 0,075 | 0,116 | 0,275 | 0,427 | 0,513 | 0,658 | 0,757 | 0,078 | 0,158 | 0,263 | 0,284 | 0,269 | 0,276 | 0,199 |
| I8 | | 0,103 | 0,137 | 0,303 | 0,429 | 0,512 | 0,674 | 0,862 | 0,095 | 0,157 | 0,232 | 0,257 | 0,266 | 0,270 | 0,227 |
| | | 0,093 | 0,138 | 0,283 | 0,401 | 0,472 | 0,634 | 0,768 | 0,089 | 0,147 | 0,216 | 0,258 | 0,257 | 0,249 | 0,212 |

Tabla A X.46. Porcentajes de inhibición. Ensayo CON adición de medio nutriente (*T. pseudonana* - R. Iro)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|--------|--------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| I2 | -16,52 | -1,08 | -8,93 | -5,72 | 15,67 | 19,03 |
| I3 | -22,61 | 10,39 | 23,18 | 15,84 | 26,50 | 19,27 |
| I4 | 4,35 | 4,42 | -12,11 | -8,47 | 15,28 | 23,49 |
| I5 | -0,87 | 7,53 | -7,82 | -5,06 | 13,81 | 25,08 |
| I6 | -8,70 | 8,24 | 0,07 | -0,33 | 17,81 | 17,99 |
| I7 | -14,78 | 3,94 | -1,59 | -1,54 | 14,69 | 11,39 |
| I8 | -31,30 | -6,81 | -12,25 | -13,42 | 8,54 | 14,17 |

Tabla A X.47. Porcentajes de inhibición. Ensayo SIN adición de medio nutriente (*T. pseudonana* - R. Iro)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| I2 | 0,883 | 0,288 | 0,210 | 0,120 | 0,033 | 0,005 |
| I3 | 1,427 | 1,039 | 0,809 | 0,637 | 0,452 | 0,260 |
| I4 | 1,584 | 1,095 | 0,643 | 0,426 | 0,217 | 0,117 |
| I5 | 1,550 | 0,920 | 0,756 | 0,591 | 0,419 | 0,242 |
| I6 | 1,886 | 0,858 | 0,640 | 0,482 | 0,347 | 0,174 |
| I7 | 1,838 | 0,828 | 0,578 | 0,438 | 0,331 | 0,174 |
| I8 | 1,786 | 0,887 | 0,617 | 0,476 | 0,366 | 0,207 |

Tabla A X.48. Índice de eutrofización -IE- (*T. pseudonana* - R. Iro)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 144 | 240 |
| I2 | 1,427 | 1,039 | 0,809 | 0,637 | 0,452 | 0,260 |
| I3 | 1,584 | 1,095 | 0,643 | 0,426 | 0,217 | 0,117 |
| I4 | 1,550 | 0,920 | 0,756 | 0,591 | 0,419 | 0,242 |
| I5 | 1,886 | 0,858 | 0,640 | 0,482 | 0,347 | 0,174 |
| I6 | 1,838 | 0,828 | 0,578 | 0,438 | 0,331 | 0,174 |
| I7 | 1,786 | 0,887 | 0,617 | 0,476 | 0,366 | 0,207 |
| I8 | 1,532 | 0,679 | 0,522 | 0,431 | 0,302 | 0,179 |

2.4. BAHÍA DE ALGECIRAS

2.4.1. *Nannochloropsis gaditana*

Tabla A X.49.

Evolución de la biomasa de *Nannochloropsis gaditana*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| | | <i>N. gaditana</i> . Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Ensayo <u>CON</u> adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | Ensayo <u>SIN</u> adición de medio nutriente f/2 | | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | 10 |
| | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| Control | | 0,130 | 0,237 | 0,369 | 0,616 | 0,869 | 1,123 | 1,274 | 0,137 | 0,261 | 0,366 | 0,456 | 0,518 | 0,526 | 0,565 |
| | | 0,152 | 0,217 | 0,301 | 0,450 | 0,718 | 1,137 | 1,309 | 0,128 | 0,202 | 0,285 | 0,355 | 0,428 | 0,482 | 0,507 |
| AI 1A | | 0,164 | 0,233 | 0,335 | 0,477 | 0,755 | 1,271 | 1,438 | 0,146 | 0,246 | 0,358 | 0,444 | 0,529 | 0,638 | 0,729 |
| | | 0,138 | 0,207 | 0,297 | 0,425 | 0,673 | 1,197 | 1,506 | 0,163 | 0,240 | 0,340 | 0,407 | 0,490 | 0,625 | 0,713 |
| AI 1B | | 0,152 | 0,221 | 0,344 | 0,476 | 0,784 | 1,232 | 1,464 | 0,154 | 0,272 | 0,386 | 0,449 | 0,533 | 0,658 | 0,750 |
| | | 0,164 | 0,228 | 0,328 | 0,446 | 0,682 | 1,281 | 1,542 | 0,146 | 0,231 | 0,334 | 0,396 | 0,485 | 0,611 | 0,706 |
| AI 1E | | 0,165 | 0,259 | 0,375 | 0,561 | 0,845 | 1,298 | 1,549 | 0,167 | 0,308 | 0,466 | 0,600 | 0,723 | 0,885 | 1,033 |
| | | 0,147 | 0,227 | 0,339 | 0,499 | 0,757 | 1,245 | 1,477 | 0,163 | 0,257 | 0,313 | 0,430 | 0,535 | 0,732 | 0,889 |
| AI 2A | | 0,160 | 0,260 | 0,381 | 0,601 | 0,908 | 1,268 | 1,443 | 0,160 | 0,280 | 0,434 | 0,615 | 0,790 | 1,087 | 1,275 |
| | | 0,164 | 0,250 | 0,373 | 0,571 | 0,875 | 1,273 | 1,492 | 0,143 | 0,258 | 0,389 | 0,564 | 0,719 | 0,990 | 1,176 |
| AI 2B | | 0,157 | 0,234 | 0,347 | 0,484 | 0,779 | 1,277 | 1,499 | 0,149 | 0,247 | 0,363 | 0,430 | 0,490 | 0,595 | 0,668 |
| | | 0,136 | 0,204 | 0,309 | 0,423 | 0,652 | 1,233 | 1,476 | 0,153 | 0,240 | 0,331 | 0,384 | 0,457 | 0,566 | 0,664 |
| AI 2C | | 0,134 | 0,194 | 0,287 | 0,416 | 0,631 | 1,163 | 1,382 | 0,161 | 0,271 | 0,381 | 0,435 | 0,515 | 0,588 | 0,656 |
| | | 0,141 | 0,192 | 0,272 | 0,375 | 0,579 | 1,178 | 1,405 | 0,139 | 0,239 | 0,338 | 0,408 | 0,477 | 0,569 | 0,627 |
| AI 3A | | 0,143 | 0,216 | 0,323 | 0,483 | 0,752 | 1,223 | 1,416 | 0,147 | 0,257 | 0,360 | 0,428 | 0,493 | 0,605 | 0,685 |
| | | 0,137 | 0,195 | 0,295 | 0,418 | 0,675 | 1,226 | 1,472 | 0,131 | 0,225 | 0,327 | 0,382 | 0,458 | 0,544 | 0,536 |

Tabla A X.50. Porcentajes de inhibición. Ensayo CON adición de medio nutriente (*N. gaditana*–B. Algeciras)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| AI 1A | -22,67 | -8,25 | -22,70 | -11,88 | 11,07 | 16,91 |
| AI 1B | 1,16 | 3,61 | -4,59 | -1,15 | 12,79 | 17,95 |
| AI 1E | 8,14 | 10,82 | 8,16 | 11,80 | 12,08 | 13,47 |
| AI 2A | -15,70 | -6,44 | -21,68 | -12,80 | 12,08 | 16,56 |
| AI 2B | -35,47 | -26,80 | -34,18 | -28,35 | 4,45 | 9,17 |
| AI 2C | -23,84 | -12,89 | -20,79 | -12,11 | 9,66 | 13,34 |
| AI 3A | -22,67 | -8,25 | -22,70 | -11,88 | 11,07 | 16,91 |

Tabla A X.51. Porcentajes de inhibición. Ensayo SIN adición de medio nutriente (*N. gaditana*–B. Algeciras)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| AI1A | -10,61 | 0,78 | -0,73 | 4,26 | 28,40 | 40,40 |
| AI 1B | 2,53 | 8,81 | -0,18 | 5,43 | 30,42 | 43,25 |
| AI 1E | 18,69 | 16,32 | 28,21 | 36,27 | 73,22 | 97,27 |
| AI 2A | 18,69 | 34,72 | 60,44 | 77,09 | 138,76 | 166,17 |
| AI 2B | -6,57 | 1,55 | -6,23 | -5,29 | 15,61 | 27,63 |
| AI 2C | 6,06 | 8,55 | -0,55 | 1,62 | 15,34 | 21,81 |
| AI 3A | -10,61 | 0,78 | -0,73 | 4,26 | 28,40 | 40,40 |

Tabla A X.52. Índice de eutrofización –I_E– (*N. gaditana*–B. Algeciras)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| Control | 1,151 | 0,995 | 0,696 | 0,522 | 0,376 | 0,351 |
| AI1A | 1,331 | 1,093 | 0,894 | 0,617 | 0,434 | 0,421 |
| AI 1B | 1,167 | 1,045 | 0,729 | 0,557 | 0,434 | 0,426 |
| AI 1E | 1,263 | 1,044 | 0,825 | 0,636 | 0,581 | 0,610 |
| AI 2A | 1,621 | 1,433 | 1,427 | 1,060 | 0,800 | 0,801 |
| AI 2B | 1,667 | 1,380 | 0,992 | 0,690 | 0,416 | 0,410 |
| AI 2C | 1,603 | 1,240 | 0,874 | 0,603 | 0,395 | 0,377 |
| AI 3A | 1,151 | 0,995 | 0,696 | 0,522 | 0,376 | 0,351 |

2.4.2. *Isochrysis galbana*

Tabla A X.53.
Evolución de la biomasa de *Isochrysis galbana*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| | | <i>I. galbana</i>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Ensayo CON adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | Ensayo SIN adición de medio nutriente f/2 | | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | 10 |
| | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| Control | | 0,143 | 0,234 | 0,372 | 0,501 | 0,634 | 0,947 | 1,190 | 0,149 | 0,242 | 0,270 | 0,289 | 0,293 | 0,283 | 0,261 |
| | | 0,155 | 0,225 | 0,338 | 0,477 | 0,602 | 0,919 | 1,171 | 0,188 | 0,052 | 0,285 | 0,294 | 0,297 | 0,282 | 0,269 |
| AI 1A | | 0,163 | 0,224 | 0,332 | 0,485 | 0,635 | 0,986 | 1,268 | 0,153 | 0,232 | 0,275 | 0,290 | 0,313 | 0,345 | 0,378 |
| | | 0,170 | 0,221 | 0,343 | 0,497 | 0,658 | 1,073 | 1,437 | 0,178 | 0,231 | 0,281 | 0,289 | 0,315 | 0,349 | 0,352 |
| AI 1B | | 0,188 | 0,246 | 0,359 | 0,521 | 0,686 | 1,087 | 1,438 | 0,161 | 0,241 | 0,271 | 0,308 | 0,320 | 0,322 | 0,344 |
| | | 0,162 | 0,225 | 0,343 | 0,481 | 0,621 | 0,931 | 1,177 | 0,156 | 0,219 | 0,263 | 0,281 | 0,307 | 0,343 | 0,373 |
| AI 1E | | 0,172 | 0,233 | 0,368 | 0,528 | 0,675 | 1,008 | 1,240 | 0,184 | 0,275 | 0,406 | 0,461 | 0,505 | 0,558 | 0,592 |
| | | 0,186 | 0,259 | 0,388 | 0,545 | 0,697 | 1,035 | 1,273 | 0,174 | 0,250 | 0,368 | 0,403 | 0,425 | 0,465 | 0,470 |
| AI 2A | | 0,170 | 0,243 | 0,377 | 0,518 | 0,654 | 0,945 | 1,206 | 0,166 | 0,252 | 0,374 | 0,476 | 0,568 | 0,723 | 0,851 |
| | | 0,148 | 0,222 | 0,350 | 0,518 | 0,681 | 1,075 | 1,420 | 0,163 | 0,252 | 0,371 | 0,477 | 0,566 | 0,729 | 0,884 |
| AI 2B | | 0,181 | 0,242 | 0,355 | 0,506 | 0,669 | 1,078 | 1,413 | 0,176 | 0,235 | 0,260 | 0,257 | 0,288 | 0,299 | 0,328 |
| | | 0,163 | 0,222 | 0,335 | 0,479 | 0,655 | 1,065 | 1,431 | 0,169 | 0,222 | 0,247 | 0,255 | 0,279 | 0,296 | 0,312 |
| AI 2C | | 0,171 | 0,234 | 0,360 | 0,516 | 0,656 | 0,982 | 1,269 | 0,156 | 0,227 | 0,261 | 0,284 | 0,320 | 0,349 | 0,368 |
| | | 0,164 | 0,236 | 0,405 | 0,600 | 0,801 | 1,200 | 1,535 | 0,157 | 0,214 | 0,246 | 0,269 | 0,302 | 0,308 | 0,335 |
| AI 3A | | 0,157 | 0,223 | 0,340 | 0,489 | 0,636 | 0,982 | 1,263 | 0,169 | 0,233 | 0,363 | 0,279 | 0,299 | 0,322 | 0,363 |
| | | 0,183 | 0,243 | 0,356 | 0,498 | 0,630 | 0,890 | 1,111 | 0,152 | 0,208 | 0,244 | 0,259 | 0,274 | 0,295 | 0,339 |

Tabla A X.54. Porcentajes de inhibición. Ensayo **CON** adición de medio nutriente (*I. galbana* –B. Algeciras)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| AI 1A | -24,84 | -14,56 | -4,12 | 2,03 | 6,38 | 9,79 |
| AI 1B | -16,77 | -3,40 | 5,15 | 8,10 | 7,46 | 4,46 |
| AI 1E | -8,70 | -0,73 | 5,59 | 8,42 | 8,55 | 11,88 |
| AI 2A | -25,47 | -16,02 | -5,74 | 4,48 | 14,73 | 21,18 |
| AI 2B | -16,15 | 4,37 | 14,85 | 19,62 | 17,79 | 19,68 |
| AI 2C | -21,74 | -13,59 | -4,85 | -1,28 | -2,30 | -1,41 |
| AI 3A | -24,84 | -14,56 | -4,12 | 2,03 | 6,38 | 9,79 |

Tabla A X.55. Porcentajes de inhibición. Ensayo **SIN** adición de medio nutriente (*I. galbana* –B. Algeciras)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| AI 1A | -406,98 | 3,21 | 0,81 | 17,39 | 59,21 | 106,74 |
| AI 1B | -432,56 | -0,46 | 10,57 | 22,53 | 52,63 | 107,25 |
| AI 1E | -488,37 | 90,83 | 105,69 | 126,09 | 191,67 | 264,77 |
| AI 2A | -506,98 | 90,83 | 153,66 | 218,18 | 392,54 | 628,50 |
| AI 2B | -360,47 | -25,69 | -32,11 | -12,25 | 9,65 | 52,85 |
| AI 2C | -397,67 | -11,01 | -2,44 | 22,13 | 50,88 | 102,07 |
| AI 3A | -406,98 | 3,21 | 0,81 | 17,39 | 59,21 | 106,74 |

Tabla A X.56. Índice de eutrofización –I_E– (*I. galbana* –B. Algeciras)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| Control | -0,267 | 0,529 | 0,362 | 0,270 | 0,145 | 0,094 |
| AI 1A | 1,091 | 0,639 | 0,380 | 0,310 | 0,218 | 0,176 |
| AI 1B | 1,067 | 0,545 | 0,380 | 0,306 | 0,207 | 0,186 |
| AI 1E | 1,136 | 1,017 | 0,705 | 0,562 | 0,391 | 0,305 |
| AI 2A | 1,458 | 1,202 | 0,973 | 0,821 | 0,624 | 0,562 |
| AI 2B | 0,830 | 0,377 | 0,214 | 0,198 | 0,135 | 0,119 |
| AI 2C | 1,016 | 0,545 | 0,371 | 0,334 | 0,225 | 0,192 |
| AI 3A | -0,267 | 0,529 | 0,362 | 0,270 | 0,145 | 0,094 |

2.4.3. *Tetraselmis chuii*

Tabla A X.57.

Evolución de la biomasa de *Tetraselmis chuii*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| | | <i>T. chuii</i>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Ensayo CON adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | Ensayo SIN adición de medio nutriente f/2 | | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | 10 |
| | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| Control | | 0,138 | 0,189 | 0,413 | 0,547 | 0,669 | 0,914 | 1,197 | 0,143 | 0,193 | 0,248 | 0,269 | 0,293 | 0,300 | 0,309 |
| | | 0,175 | 0,178 | 0,263 | 0,486 | 0,635 | 0,936 | 1,231 | 0,153 | 0,172 | 0,219 | 0,245 | 0,273 | 0,297 | 0,287 |
| AI 1A | | 0,159 | 0,171 | 0,246 | 0,566 | 0,729 | 1,056 | 1,301 | 0,181 | 0,237 | 0,281 | 0,304 | 0,327 | 0,318 | 0,300 |
| | | 0,163 | 0,196 | 0,268 | 0,474 | 0,696 | 1,058 | 1,346 | 0,138 | 0,190 | 0,232 | 0,248 | 0,276 | 0,291 | 0,278 |
| AI 1B | | 0,140 | 0,174 | 0,257 | 0,563 | 0,718 | 1,025 | 1,281 | 0,140 | 0,205 | 0,245 | 0,260 | 0,285 | 0,288 | 0,288 |
| | | 0,121 | 0,161 | 0,218 | 0,406 | 0,631 | 0,949 | 1,173 | 0,139 | 0,203 | 0,245 | 0,265 | 0,288 | 0,301 | 0,291 |
| AI 1E | | 0,168 | 0,179 | 0,263 | 0,542 | 0,740 | 1,102 | 1,370 | 0,143 | 0,225 | 0,354 | 0,417 | 0,465 | 0,5 | 0,517 |
| | | 0,138 | 0,144 | 0,223 | 0,476 | 0,640 | 0,947 | 1,189 | 0,146 | 0,218 | 0,317 | 0,401 | 0,436 | 0,486 | 0,505 |
| AI 2A | | 0,160 | 0,187 | 0,268 | 0,547 | 0,708 | 1,065 | 1,324 | 0,135 | 0,151 | 0,239 | 0,308 | 0,359 | 0,403 | 0,437 |
| | | 0,163 | 0,184 | 0,231 | 0,434 | 0,702 | 1,051 | 1,282 | 0,163 | 0,176 | 0,265 | 0,339 | 0,391 | 0,438 | 0,478 |
| AI 2B | | 0,134 | 0,170 | 0,228 | 0,531 | 0,715 | 1,034 | 1,254 | 0,125 | 0,182 | 0,209 | 0,233 | 0,273 | 0,296 | 0,287 |
| | | 0,139 | 0,152 | 0,188 | 0,396 | 0,677 | 0,995 | 1,229 | 0,151 | 0,183 | 0,240 | 0,254 | 0,294 | 0,303 | 0,307 |
| AI 2C | | 0,166 | 0,190 | 0,245 | 0,545 | 0,798 | 1,094 | 1,347 | 0,122 | 0,186 | 0,226 | 0,227 | 0,258 | 0,268 | 0,264 |
| | | 0,141 | 0,187 | 0,221 | 0,419 | 0,663 | 1,004 | 1,261 | 0,164 | 0,205 | 0,244 | 0,271 | 0,300 | 0,303 | 0,306 |
| AI 3A | | 0,170 | 0,187 | 0,244 | 0,519 | 0,791 | 1,123 | 1,442 | 0,159 | 0,204 | 0,242 | 0,264 | 0,285 | 0,285 | 0,287 |
| | | 0,171 | 0,181 | 0,247 | 0,485 | 0,738 | 1,125 | 1,421 | 0,158 | 0,196 | 0,237 | 0,260 | 0,277 | 0,278 | 0,299 |

Tabla A X.58..Porcentajes de inhibición. Ensayo **CON** adición de medio nutriente (*T. chuii*–B. Algeciras)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| AI 1A | 37,04 | -41,05 | -1,67 | 9,79 | 11,45 | 3,69 |
| AI 1B | -68,52 | -50,41 | -1,11 | 8,38 | 13,40 | 6,52 |
| AI 1E | -11,11 | -51,52 | -8,61 | 9,69 | 16,66 | 7,94 |
| AI 2A | -9,26 | -60,61 | -9,17 | 12,92 | 14,25 | 4,49 |
| AI 2B | 29,63 | -56,20 | -8,75 | 16,45 | 16,53 | 8,79 |
| AI 2C | -50,00 | -58,68 | -7,92 | 19,88 | 24,07 | 19,24 |
| AI 3A | 37,04 | -41,05 | -1,67 | 9,79 | 11,45 | 3,69 |

Tabla A X.59. Porcentajes de inhibición. Ensayo **SIN** adición de medio nutriente (*T. chuii*–B. Algeciras)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| AI1A | 56,52 | 13,45 | 6,88 | 5,19 | -3,65 | -13,67 |
| AI 1B | 86,96 | 23,39 | 12,84 | 8,89 | 2,99 | 0,00 |
| AI 1E | 123,19 | 123,39 | 142,66 | 126,67 | 131,56 | 144,33 |
| AI 2A | -57,97 | 20,47 | 60,09 | 67,41 | 80,40 | 105,67 |
| AI 2B | 28,99 | 1,17 | -3,21 | 7,78 | 7,31 | 6,00 |
| AI 2C | 52,17 | 7,60 | -2,75 | 0,74 | -5,32 | -5,33 |
| AI 3A | 56,52 | 13,45 | 6,88 | 5,19 | -3,65 | -13,67 |

Tabla A X.60. Índice de eutrofización –I_E– (*T. chuii*–B. Algeciras)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| Control | 1,278 | 0,471 | 0,303 | 0,272 | 0,196 | 0,142 |
| AI1A | 1,459 | 0,907 | 0,329 | 0,261 | 0,169 | 0,118 |
| AI 1B | 7,588 | 1,172 | 0,346 | 0,274 | 0,178 | 0,133 |
| AI 1E | 3,208 | 2,170 | 0,804 | 0,563 | 0,389 | 0,321 |
| AI 2A | 0,592 | 1,441 | 0,534 | 0,404 | 0,309 | 0,279 |
| AI 2B | 1,271 | 1,088 | 0,321 | 0,252 | 0,180 | 0,138 |
| AI 2C | 3,889 | 1,227 | 0,320 | 0,229 | 0,149 | 0,113 |
| AI 3A | 1,278 | 0,471 | 0,303 | 0,272 | 0,196 | 0,142 |

2.4.4. *Thalassiosira pseudonana*

Tabla A X.61.

Evolución de la biomasa de *Thalassiosira pseudonana*. Ensayo de AGUAS RECEPTORAS.

| | | <i>T. pseudonana</i>. Valores de absorbancia de los cultivos a lo largo del periodo de ensayo | | | | | | | | | | | | | |
|---------|--|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | Ensayo CON adición de medio nutriente f/2 | | | | | | | Ensayo SIN adición de medio nutriente f/2 | | | | | | |
| | | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | 10 | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 7 | 10 |
| | | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 | 0 | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| Control | | 0,105 | 0,132 | 0,260 | 0,362 | 0,458 | 0,656 | 0,798 | 0,109 | 0,132 | 0,142 | 0,158 | 0,132 | 0,138 | 0,129 |
| | | 0,086 | 0,104 | 0,195 | 0,307 | 0,408 | 0,637 | 0,794 | 0,064 | 0,081 | 0,084 | 0,085 | 0,093 | 0,079 | 0,070 |
| AI 1A | | 0,111 | 0,124 | 0,185 | 0,307 | 0,396 | 0,621 | 0,827 | 0,086 | 0,100 | 0,118 | 0,116 | 0,130 | 0,101 | 0,085 |
| | | 0,107 | 0,122 | 0,180 | 0,329 | 0,407 | 0,647 | 0,826 | 0,088 | 0,101 | 0,113 | 0,115 | 0,105 | 0,107 | 0,100 |
| AI 1B | | 0,111 | 0,125 | 0,211 | 0,327 | 0,430 | 0,682 | 0,899 | 0,094 | 0,094 | 0,098 | 0,090 | 0,094 | 0,078 | 0,080 |
| | | 0,088 | 0,101 | 0,179 | 0,291 | 0,388 | 0,624 | 0,832 | 0,110 | 0,123 | 0,124 | 0,120 | 0,115 | 0,107 | 0,100 |
| AI 1E | | 0,107 | 0,130 | 0,253 | 0,377 | 0,472 | 0,717 | 0,914 | 0,111 | 0,142 | 0,214 | 0,229 | 0,237 | 0,254 | 0,270 |
| | | 0,110 | 0,131 | 0,230 | 0,358 | 0,459 | 0,687 | 0,928 | 0,076 | 0,102 | 0,171 | 0,182 | 0,193 | 0,181 | 0,207 |
| AI 2A | | 0,084 | 0,117 | 0,234 | 0,353 | 0,451 | 0,673 | 0,896 | 0,103 | 0,133 | 0,169 | 0,183 | 0,196 | 0,231 | 0,231 |
| | | 0,119 | 0,143 | 0,239 | 0,364 | 0,462 | 0,723 | 0,993 | 0,117 | 0,139 | 0,172 | 0,185 | 0,198 | 0,194 | 0,168 |
| AI 2B | | 0,109 | 0,126 | 0,210 | 0,352 | 0,453 | 0,710 | 0,932 | 0,082 | 0,095 | 0,106 | 0,094 | 0,106 | 0,088 | 0,066 |
| | | 0,108 | 0,124 | 0,196 | 0,336 | 0,429 | 0,695 | 0,919 | 0,098 | 0,113 | 0,129 | 0,136 | 0,133 | 0,110 | 0,110 |
| AI 2C | | 0,117 | 0,139 | 0,256 | 0,370 | 0,479 | 0,722 | 0,969 | 0,115 | 0,134 | 0,143 | 0,135 | 0,132 | 0,122 | 0,113 |
| | | 0,101 | 0,124 | 0,196 | 0,328 | 0,423 | 0,661 | 0,886 | 0,112 | 0,135 | 0,145 | 0,141 | 0,144 | 0,129 | 0,122 |
| AI 3A | | 0,088 | 0,102 | 0,199 | 0,324 | 0,418 | 0,660 | 0,879 | 0,074 | 0,095 | 0,101 | 0,094 | 0,094 | 0,081 | 0,079 |
| | | 0,094 | 0,106 | 0,194 | 0,321 | 0,421 | 0,666 | 0,902 | 0,102 | 0,114 | 0,128 | 0,124 | 0,122 | 0,111 | 0,107 |

Tabla A X.62. Porcentajes de inhibición. Ensayo **CON** adición de medio nutriente (*T. pseudonana*-Ría de Huelva)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|-------|------|-------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| AI 1A | -40,00 | -27,65 | -12,34 | -8,30 | 0,45 | 9,35 |
| AI 1B | -2,22 | 0,76 | 8,37 | 5,78 | 7,71 | 15,99 |
| AI 1E | 26,67 | 2,27 | 7,53 | 5,19 | 8,26 | 20,34 |
| AI 2A | -26,67 | -28,41 | -1,46 | -1,48 | 7,80 | 16,63 |
| AI 2B | 0,00 | -11,36 | 0,42 | 1,33 | 5,72 | 16,85 |
| AI 2C | -42,22 | -20,08 | -3,14 | -2,67 | 3,81 | 14,13 |
| AI 3A | -40,00 | -27,65 | -12,34 | -8,30 | 0,45 | 9,35 |

Tabla A X.63. Porcentajes de inhibición. Ensayo **SIN** adición de medio nutriente (*T. pseudonana*-Ría de Huelva)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------|---------|---------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| AI1A | -32,50 | 7,55 | -18,57 | 17,31 | -22,73 | -57,69 |
| AI 1B | -67,50 | -66,04 | -91,43 | -90,38 | -143,18 | -192,31 |
| AI 1E | 42,50 | 273,58 | 220,00 | 367,31 | 463,64 | 1015,38 |
| AI 2A | 30,00 | 128,30 | 111,43 | 234,62 | 365,91 | 588,46 |
| AI 2B | -30,00 | 3,77 | -28,57 | 13,46 | -59,09 | -115,38 |
| AI 2C | 5,00 | 15,09 | -30,00 | -5,77 | -45,45 | -69,23 |
| AI 3A | -32,50 | 7,55 | -18,57 | 17,31 | -22,73 | -57,69 |

Tabla A X.64. Índice de eutrofización $-I_E-$ (*T. pseudonana*-Ría de Huelva)

| Estación de muestreo | Tiempo de exposición (h) | | | | | |
|----------------------|--------------------------|-------|-------|-------|--------|--------|
| | 24 | 48 | 72 | 96 | 168 | 240 |
| Control | 0,889 | 0,201 | 0,146 | 0,077 | 0,040 | 0,019 |
| AI1A | 1,000 | 0,298 | 0,136 | 0,099 | 0,031 | 0,007 |
| AI 1B | 0,295 | 0,068 | 0,012 | 0,007 | -0,016 | -0,015 |
| AI 1E | 1,000 | 0,733 | 0,436 | 0,342 | 0,208 | 0,172 |
| AI 2A | 1,576 | 0,640 | 0,314 | 0,262 | 0,173 | 0,110 |
| AI 2B | 0,622 | 0,235 | 0,104 | 0,086 | 0,015 | -0,002 |
| AI 2C | 1,615 | 0,289 | 0,106 | 0,075 | 0,021 | 0,005 |
| AI 3A | 0,889 | 0,201 | 0,146 | 0,077 | 0,040 | 0,019 |

ANEXO XI. COEFICIENTES ESTADÍSTICOS

Tabla A XI.1.
Coeficientes para el test de Shapiro-Wilk (Conover, 1980)

| i \ n | <u>Número de Observaciones</u> | | | | | | | | |
|-------|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| 1 | 0,7071 | 0,7071 | 0,6872 | 0,6646 | 0,6431 | 0,6233 | 0,6052 | 0,5888 | 0,5739 |
| 2 | - | 0,0000 | 0,1667 | 0,2413 | 0,2806 | 0,3031 | 0,3164 | 0,3244 | 0,3291 |
| 3 | - | - | - | 0,0000 | 0,0875 | 0,1401 | 0,1743 | 0,1976 | 0,2141 |
| 4 | - | - | - | - | - | 0,0000 | 0,0561 | 0,0947 | 0,1224 |
| 5 | - | - | - | - | - | - | - | 0,0000 | 0,0399 |

| i \ n | <u>Número de Observaciones</u> | | | | | | | | | |
|-------|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 |
| 1 | 0,5601 | 0,5475 | 0,5359 | 0,5251 | 0,5150 | 0,5056 | 0,4968 | 0,4886 | 0,4808 | 0,4734 |
| 2 | 0,3315 | 0,3325 | 0,3325 | 0,3318 | 0,3306 | 0,3209 | 0,3273 | 0,3253 | 0,3232 | 0,3211 |
| 3 | 0,2260 | 0,2347 | 0,2412 | 0,2460 | 0,2495 | 0,2521 | 0,2540 | 0,2553 | 0,2561 | 0,2565 |
| 4 | 0,1429 | 0,1586 | 0,1707 | 0,1802 | 0,1878 | 0,1939 | 0,1988 | 0,2027 | 0,2059 | 0,2085 |
| 5 | 0,0695 | 0,0922 | 0,1099 | 0,1240 | 0,1353 | 0,1447 | 0,1524 | 0,1587 | 0,1641 | 0,1686 |
| 6 | 0,0000 | 0,0303 | 0,0539 | 0,0727 | 0,0880 | 0,1005 | 0,1109 | 0,1197 | 0,1271 | 0,1334 |
| 7 | - | - | 0,0000 | 0,0240 | 0,0433 | 0,0593 | 0,0725 | 0,0837 | 0,0932 | 0,1013 |
| 8 | - | - | - | - | 0,0000 | 0,0196 | 0,0359 | 0,0496 | 0,0612 | 0,0711 |
| 9 | - | - | - | - | - | - | 0,0000 | 0,0163 | 0,0303 | 0,0422 |
| 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,0000 | 0,0140 |

| i \ n | <u>Número de Observaciones</u> | | | | | | | | | |
|-------|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 |
| 1 | 0,4643 | 0,4590 | 0,4542 | 0,4493 | 0,4450 | 0,4407 | 0,4366 | 0,4328 | 0,4291 | 0,4254 |
| 2 | 0,3185 | 0,3156 | 0,3126 | 0,3098 | 0,3069 | 0,3043 | 0,3018 | 0,2992 | 0,2968 | 0,2944 |
| 3 | 0,2578 | 0,2571 | 0,2563 | 0,2554 | 0,2543 | 0,2533 | 0,2522 | 0,2510 | 0,2499 | 0,2487 |
| 4 | 0,2119 | 0,2131 | 0,2139 | 0,2145 | 0,2148 | 0,2151 | 0,2152 | 0,2151 | 0,2150 | 0,2148 |
| 5 | 0,1736 | 0,1764 | 0,1787 | 0,1807 | 0,1822 | 0,1836 | 0,1848 | 0,1857 | 0,1864 | 0,1870 |
| 6 | 0,1399 | 0,1443 | 0,1480 | 0,1512 | 0,1539 | 0,1563 | 0,1584 | 0,1601 | 0,1616 | 0,1630 |
| 7 | 0,1092 | 0,1150 | 0,1201 | 0,1245 | 0,1283 | 0,1316 | 0,1346 | 0,1372 | 0,1395 | 0,1415 |
| 8 | 0,0804 | 0,0878 | 0,0941 | 0,0997 | 0,1046 | 0,1089 | 0,1128 | 0,1162 | 0,1192 | 0,1219 |
| 9 | 0,0530 | 0,0618 | 0,0696 | 0,0764 | 0,0923 | 0,0876 | 0,0923 | 0,0965 | 0,1002 | 0,1036 |
| 10 | 0,0263 | 0,0368 | 0,0459 | 0,0539 | 0,0610 | 0,0672 | 0,0728 | 0,0778 | 0,0822 | 0,0862 |
| 11 | 0,0000 | 0,0122 | 0,0228 | 0,0321 | 0,0403 | 0,0476 | 0,0540 | 0,0598 | 0,0650 | 0,0697 |
| 12 | - | - | 0,0000 | 0,0107 | 0,0200 | 0,0284 | 0,0358 | 0,0424 | 0,0483 | 0,0537 |
| 13 | - | - | - | - | 0,0000 | 0,0094 | 0,0178 | 0,0253 | 0,0320 | 0,0381 |
| 14 | - | - | - | - | - | - | 0,0000 | 0,0084 | 0,0159 | 0,0227 |
| 15 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,0000 | 0,0076 |

Tabla A XI.1. (Cont.)
Coeficientes para el test de Shapiro-Wilk (Conover, 1980)

| i \ n | <u>Número de Observaciones</u> | | | | | | | | | |
|-------|--------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40 |
| 1 | 0,4220 | 0,4188 | 0,4156 | 0,4127 | 0,4096 | 0,4068 | 0,4040 | 0,4015 | 0,3989 | 0,3964 |
| 2 | 0,2921 | 0,2898 | 0,2876 | 0,2854 | 0,2834 | 0,2813 | 0,2794 | 0,2774 | 0,2755 | 0,2737 |
| 3 | 0,2475 | 0,2462 | 0,2451 | 0,2439 | 0,2427 | 0,2415 | 0,2403 | 0,2391 | 0,2380 | 0,2368 |
| 4 | 0,2145 | 0,2141 | 0,2137 | 0,2132 | 0,2127 | 0,2121 | 0,2116 | 0,2110 | 0,2104 | 0,2098 |
| 5 | 0,1874 | 0,1878 | 0,1880 | 0,1882 | 0,1883 | 0,1883 | 0,1883 | 0,1881 | 0,1880 | 0,1878 |
| 6 | 0,1641 | 0,1651 | 0,1660 | 0,1667 | 0,1673 | 0,1678 | 0,1663 | 0,1686 | 0,1689 | 0,1691 |
| 7 | 0,1433 | 0,1449 | 0,1463 | 0,1475 | 0,1487 | 0,1496 | 0,1505 | 0,1513 | 0,1520 | 0,1526 |
| 8 | 0,1243 | 0,1265 | 0,1284 | 0,1301 | 0,1317 | 0,1331 | 0,1344 | 0,1356 | 0,1366 | 0,1376 |
| 9 | 0,1066 | 0,1093 | 0,1118 | 0,1140 | 0,1160 | 0,1179 | 0,1196 | 0,1211 | 0,1225 | 0,1237 |
| 10 | 0,0899 | 0,0931 | 0,0961 | 0,0988 | 0,1013 | 0,1036 | 0,1056 | 0,1075 | 0,1092 | 0,1108 |
| 11 | 0,0739 | 0,0777 | 0,0812 | 0,0844 | 0,0873 | 0,0900 | 0,0924 | 0,0947 | 0,0967 | 0,0986 |
| 12 | 0,0585 | 0,0629 | 0,0669 | 0,0706 | 0,0739 | 0,0770 | 0,0798 | 0,0824 | 0,0848 | 0,0870 |
| 13 | 0,0435 | 0,0485 | 0,0530 | 0,0572 | 0,0610 | 0,0645 | 0,0677 | 0,0706 | 0,0733 | 0,0759 |
| 14 | 0,0289 | 0,0344 | 0,0395 | 0,0441 | 0,0484 | 0,0523 | 0,0559 | 0,0592 | 0,0622 | 0,0651 |
| 15 | 0,0144 | 0,0206 | 0,0262 | 0,0314 | 0,0361 | 0,0404 | 0,0444 | 0,0481 | 0,0515 | 0,0546 |
| 16 | 0,0000 | 0,0068 | 0,0131 | 0,0187 | 0,0239 | 0,0287 | 0,0331 | 0,0372 | 0,0409 | 0,0444 |
| 17 | - | - | 0,0000 | 0,0062 | 0,0119 | 0,0172 | 0,0220 | 0,0264 | 0,0305 | 0,0343 |
| 18 | - | - | - | - | 0,0000 | 0,0057 | 0,0110 | 0,0158 | 0,0203 | 0,0244 |
| 19 | - | - | - | - | - | - | 0,0000 | 0,0053 | 0,0101 | 0,0146 |
| 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,0000 | 0,0049 |
| i \ n | <u>Número de Observaciones</u> | | | | | | | | | |
| | 41 | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 |
| 1 | 0,3940 | 0,3917 | 0,3894 | 0,3872 | 0,3850 | 0,3830 | 0,3808 | 0,3789 | 0,3770 | 0,3751 |
| 2 | 0,2719 | 0,2701 | 0,2684 | 0,2667 | 0,2651 | 0,2635 | 0,2620 | 0,2604 | 0,2589 | 0,2574 |
| 3 | 0,2357 | 0,2345 | 0,2334 | 0,2323 | 0,2313 | 0,2302 | 0,2291 | 0,2281 | 0,2271 | 0,2260 |
| 4 | 0,2091 | 0,2085 | 0,2078 | 0,2072 | 0,2065 | 0,2058 | 0,2052 | 0,2045 | 0,2038 | 0,2032 |
| 5 | 0,1876 | 0,1874 | 0,1871 | 0,1868 | 0,1865 | 0,1862 | 0,1859 | 0,1855 | 0,1851 | 0,1847 |
| 6 | 0,1693 | 0,1694 | 0,1695 | 0,1695 | 0,1695 | 0,1695 | 0,1695 | 0,1693 | 0,1692 | 0,1691 |
| 7 | 0,1531 | 0,1535 | 0,1539 | 0,1542 | 0,1545 | 0,1548 | 0,1550 | 0,1551 | 0,1553 | 0,1554 |
| 8 | 0,1384 | 0,1392 | 0,1398 | 0,1405 | 0,1410 | 0,1415 | 0,1420 | 0,1423 | 0,1427 | 0,1430 |
| 9 | 0,1249 | 0,1259 | 0,1269 | 0,1278 | 0,1286 | 0,1293 | 0,1300 | 0,1306 | 0,1312 | 0,1317 |
| 10 | 0,1123 | 0,1136 | 0,1149 | 0,1160 | 0,1170 | 0,1180 | 0,1189 | 0,1197 | 0,1205 | 0,1212 |
| 11 | 0,1004 | 0,1020 | 0,1035 | 0,1049 | 0,1062 | 0,1073 | 0,1085 | 0,1095 | 0,1105 | 0,1113 |
| 12 | 0,0891 | 0,0909 | 0,0927 | 0,0943 | 0,0959 | 0,0972 | 0,0986 | 0,0998 | 0,1010 | 0,1020 |
| 13 | 0,0782 | 0,0804 | 0,0824 | 0,0842 | 0,0860 | 0,0876 | 0,0892 | 0,0906 | 0,0919 | 0,0932 |
| 14 | 0,0677 | 0,0701 | 0,0724 | 0,0745 | 0,0765 | 0,0783 | 0,0801 | 0,0817 | 0,0832 | 0,0846 |
| 15 | 0,0575 | 0,0602 | 0,0628 | 0,0651 | 0,0673 | 0,0694 | 0,0713 | 0,0731 | 0,0748 | 0,0764 |
| 16 | 0,0476 | 0,0506 | 0,0534 | 0,0560 | 0,0584 | 0,0607 | 0,0628 | 0,0648 | 0,0667 | 0,0685 |
| 17 | 0,0379 | 0,0411 | 0,0442 | 0,0471 | 0,0497 | 0,0522 | 0,0546 | 0,0568 | 0,0588 | 0,0608 |
| 18 | 0,0283 | 0,0318 | 0,0352 | 0,0383 | 0,0412 | 0,0439 | 0,0465 | 0,0489 | 0,0511 | 0,0532 |
| 19 | 0,0188 | 0,0227 | 0,0263 | 0,0296 | 0,0328 | 0,0357 | 0,0385 | 0,0411 | 0,0436 | 0,0459 |
| 20 | 0,0094 | 0,0136 | 0,0175 | 0,0211 | 0,0245 | 0,0277 | 0,0307 | 0,0335 | 0,0361 | 0,0386 |
| 21 | 0,0000 | 0,0045 | 0,0087 | 0,0126 | 0,0163 | 0,0197 | 0,0229 | 0,0259 | 0,0288 | 0,0314 |
| 22 | - | - | 0,0000 | 0,0042 | 0,0081 | 0,0118 | 0,0153 | 0,0185 | 0,0215 | 0,0244 |
| 23 | - | - | - | - | 0,0000 | 0,0039 | 0,0076 | 0,0111 | 0,0143 | 0,0174 |
| 24 | - | - | - | - | - | - | 0,0000 | 0,0037 | 0,0071 | 0,0104 |
| 25 | - | - | - | - | - | - | - | - | 0,0000 | 0,0035 |

Tabla A XI.2.
Cuantiles del test de Shapiro-Wilk (Conover, 1980)

| n | 0,01 | 0,02 | 0,05 | 0,10 | 0,50 | 0,90 | 0,95 | 0,98 | 0,99 |
|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 3 | 0,753 | 0,756 | 0,767 | 0,789 | 0,959 | 0,998 | 0,999 | 1,000 | 1,000 |
| 4 | 0,687 | 0,707 | 0,748 | 0,792 | 0,935 | 0,987 | 0,992 | 0,996 | 0,997 |
| 5 | 0,686 | 0,715 | 0,762 | 0,806 | 0,927 | 0,979 | 0,986 | 0,991 | 0,993 |
| 6 | 0,713 | 0,743 | 0,788 | 0,826 | 0,927 | 0,974 | 0,981 | 0,986 | 0,989 |
| 7 | 0,730 | 0,760 | 0,803 | 0,838 | 0,928 | 0,972 | 0,979 | 0,985 | 0,988 |
| 8 | 0,749 | 0,778 | 0,818 | 0,851 | 0,932 | 0,972 | 0,978 | 0,984 | 0,987 |
| 9 | 0,764 | 0,791 | 0,829 | 0,859 | 0,935 | 0,972 | 0,978 | 0,984 | 0,986 |
| 10 | 0,781 | 0,806 | 0,842 | 0,869 | 0,938 | 0,972 | 0,978 | 0,983 | 0,986 |
| 11 | 0,792 | 0,817 | 0,850 | 0,876 | 0,940 | 0,973 | 0,979 | 0,984 | 0,986 |
| 12 | 0,805 | 0,828 | 0,859 | 0,883 | 0,943 | 0,973 | 0,979 | 0,984 | 0,986 |
| 13 | 0,814 | 0,837 | 0,866 | 0,889 | 0,945 | 0,974 | 0,979 | 0,984 | 0,986 |
| 14 | 0,825 | 0,846 | 0,874 | 0,895 | 0,947 | 0,975 | 0,980 | 0,984 | 0,986 |
| 15 | 0,835 | 0,855 | 0,881 | 0,901 | 0,950 | 0,975 | 0,980 | 0,984 | 0,987 |
| 16 | 0,844 | 0,863 | 0,887 | 0,906 | 0,952 | 0,976 | 0,981 | 0,985 | 0,987 |
| 17 | 0,851 | 0,869 | 0,892 | 0,910 | 0,954 | 0,977 | 0,981 | 0,985 | 0,987 |
| 18 | 0,858 | 0,874 | 0,897 | 0,914 | 0,956 | 0,978 | 0,982 | 0,986 | 0,988 |
| 19 | 0,863 | 0,879 | 0,901 | 0,917 | 0,957 | 0,978 | 0,982 | 0,986 | 0,988 |
| 20 | 0,868 | 0,884 | 0,905 | 0,920 | 0,959 | 0,979 | 0,983 | 0,986 | 0,988 |
| 21 | 0,873 | 0,888 | 0,908 | 0,923 | 0,960 | 0,980 | 0,983 | 0,987 | 0,989 |
| 22 | 0,878 | 0,892 | 0,911 | 0,926 | 0,961 | 0,980 | 0,984 | 0,987 | 0,989 |
| 23 | 0,881 | 0,895 | 0,914 | 0,928 | 0,962 | 0,981 | 0,984 | 0,987 | 0,989 |
| 24 | 0,884 | 0,898 | 0,916 | 0,930 | 0,963 | 0,981 | 0,984 | 0,987 | 0,989 |
| 25 | 0,888 | 0,901 | 0,918 | 0,931 | 0,964 | 0,981 | 0,985 | 0,988 | 0,989 |
| 26 | 0,891 | 0,904 | 0,920 | 0,933 | 0,965 | 0,982 | 0,985 | 0,988 | 0,989 |
| 27 | 0,894 | 0,906 | 0,923 | 0,935 | 0,965 | 0,982 | 0,985 | 0,988 | 0,990 |
| 28 | 0,896 | 0,908 | 0,924 | 0,936 | 0,966 | 0,982 | 0,985 | 0,988 | 0,990 |
| 29 | 0,898 | 0,910 | 0,926 | 0,937 | 0,966 | 0,982 | 0,985 | 0,988 | 0,990 |
| 30 | 0,900 | 0,912 | 0,927 | 0,939 | 0,967 | 0,983 | 0,985 | 0,988 | 0,990 |
| 31 | 0,902 | 0,914 | 0,929 | 0,940 | 0,967 | 0,983 | 0,986 | 0,988 | 0,990 |
| 32 | 0,904 | 0,915 | 0,930 | 0,941 | 0,968 | 0,983 | 0,986 | 0,988 | 0,990 |
| 33 | 0,906 | 0,917 | 0,931 | 0,942 | 0,968 | 0,983 | 0,986 | 0,989 | 0,990 |
| 34 | 0,908 | 0,919 | 0,933 | 0,943 | 0,969 | 0,983 | 0,986 | 0,989 | 0,990 |
| 35 | 0,910 | 0,920 | 0,934 | 0,944 | 0,969 | 0,984 | 0,986 | 0,989 | 0,990 |
| 36 | 0,912 | 0,922 | 0,935 | 0,945 | 0,970 | 0,984 | 0,986 | 0,989 | 0,990 |
| 37 | 0,914 | 0,924 | 0,936 | 0,946 | 0,970 | 0,984 | 0,987 | 0,989 | 0,990 |
| 38 | 0,916 | 0,925 | 0,938 | 0,947 | 0,971 | 0,984 | 0,987 | 0,989 | 0,990 |
| 39 | 0,917 | 0,927 | 0,939 | 0,948 | 0,971 | 0,984 | 0,987 | 0,989 | 0,991 |
| 40 | 0,919 | 0,928 | 0,940 | 0,949 | 0,972 | 0,985 | 0,987 | 0,989 | 0,991 |
| 41 | 0,920 | 0,929 | 0,941 | 0,950 | 0,972 | 0,985 | 0,987 | 0,989 | 0,991 |
| 42 | 0,922 | 0,930 | 0,942 | 0,951 | 0,972 | 0,985 | 0,987 | 0,989 | 0,991 |
| 43 | 0,923 | 0,932 | 0,943 | 0,951 | 0,973 | 0,985 | 0,987 | 0,990 | 0,991 |
| 44 | 0,924 | 0,933 | 0,944 | 0,952 | 0,973 | 0,985 | 0,987 | 0,990 | 0,991 |
| 45 | 0,926 | 0,934 | 0,945 | 0,953 | 0,973 | 0,985 | 0,988 | 0,990 | 0,991 |
| 46 | 0,927 | 0,935 | 0,945 | 0,953 | 0,974 | 0,985 | 0,988 | 0,990 | 0,991 |
| 47 | 0,928 | 0,936 | 0,946 | 0,954 | 0,974 | 0,985 | 0,988 | 0,990 | 0,991 |
| 48 | 0,929 | 0,937 | 0,947 | 0,954 | 0,974 | 0,985 | 0,988 | 0,990 | 0,991 |
| 49 | 0,929 | 0,937 | 0,947 | 0,955 | 0,974 | 0,985 | 0,988 | 0,990 | 0,991 |
| 50 | 0,930 | 0,938 | 0,947 | 0,955 | 0,974 | 0,985 | 0,988 | 0,990 | 0,991 |

Tabla A XI.3.
Percentiles de la distribución Chi-cuadrado

| v | 1- α | | | | | | | | | |
|-----|-------------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 0,005 | 0,010 | 0,025 | 0,050 | 0,100 | 0,900 | 0,950 | 0,975 | 0,990 | 0,995 |
| 1 | 0,0393 | 0,0157 | 0,0982 | 0,0393 | 0,0158 | 2,71 | 3,84 | 5,02 | 6,63 | 7,88 |
| 2 | 0,0100 | 0,0201 | 0,0506 | 0,103 | 0,211 | 4,61 | 5,99 | 7,38 | 9,21 | 10,60 |
| 3 | 0,072 | 0,115 | 0,216 | 0,352 | 0,584 | 6,25 | 7,81 | 9,35 | 11,34 | 12,84 |
| 4 | 0,207 | 0,297 | 0,484 | 0,711 | 1,064 | 7,78 | 9,49 | 11,14 | 13,28 | 14,86 |
| 5 | 0,412 | 0,554 | 0,831 | 1,145 | 1,61 | 9,24 | 11,07 | 12,83 | 15,09 | 16,75 |
| 6 | 0,676 | 0,872 | 1,24 | 1,64 | 2,20 | 10,64 | 12,59 | 14,45 | 16,81 | 18,55 |
| 7 | 0,989 | 1,24 | 1,69 | 2,17 | 2,83 | 12,02 | 14,07 | 16,01 | 18,48 | 20,28 |
| 8 | 1,34 | 1,65 | 2,18 | 2,73 | 3,49 | 13,36 | 15,51 | 17,53 | 20,09 | 21,96 |
| 9 | 1,73 | 2,09 | 2,70 | 3,33 | 4,17 | 14,68 | 16,92 | 19,02 | 21,67 | 23,59 |
| 10 | 2,16 | 2,56 | 3,25 | 3,94 | 4,87 | 15,99 | 18,31 | 20,48 | 23,21 | 25,19 |
| 11 | 2,60 | 3,05 | 3,82 | 3,57 | 5,58 | 17,28 | 19,68 | 21,92 | 24,73 | 26,76 |
| 12 | 3,07 | 3,57 | 4,40 | 5,23 | 6,30 | 18,55 | 21,03 | 23,34 | 26,22 | 28,30 |
| 13 | 3,57 | 4,11 | 5,01 | 5,89 | 7,04 | 19,81 | 22,36 | 24,74 | 27,69 | 29,82 |
| 14 | 4,07 | 4,66 | 5,63 | 6,57 | 7,79 | 21,06 | 23,68 | 26,12 | 29,14 | 31,32 |
| 15 | 4,60 | 5,23 | 6,26 | 7,26 | 8,55 | 22,31 | 25,00 | 27,49 | 30,58 | 32,80 |
| 16 | 5,14 | 5,81 | 6,91 | 7,96 | 9,31 | 23,54 | 26,30 | 28,85 | 32,00 | 34,27 |
| 17 | 5,70 | 6,41 | 7,56 | 8,67 | 10,09 | 24,77 | 27,59 | 30,19 | 33,41 | 35,72 |
| 18 | 6,26 | 7,01 | 8,23 | 9,39 | 10,86 | 25,99 | 28,87 | 31,53 | 34,81 | 37,16 |
| 19 | 6,84 | 7,63 | 8,91 | 10,12 | 11,65 | 27,20 | 30,14 | 32,85 | 36,19 | 38,58 |
| 20 | 7,43 | 8,26 | 9,59 | 10,85 | 12,44 | 28,41 | 31,41 | 34,17 | 37,57 | 40,00 |
| 21 | 8,03 | 8,90 | 10,28 | 11,59 | 13,24 | 29,62 | 32,67 | 35,48 | 38,93 | 41,40 |
| 22 | 8,64 | 9,54 | 10,98 | 12,34 | 14,04 | 30,81 | 33,92 | 36,78 | 40,29 | 42,80 |
| 23 | 9,26 | 10,20 | 11,69 | 13,09 | 14,85 | 32,01 | 35,17 | 38,08 | 41,64 | 44,18 |
| 24 | 9,89 | 10,86 | 12,40 | 13,85 | 15,66 | 33,20 | 36,42 | 39,36 | 42,98 | 45,56 |
| 25 | 10,52 | 11,52 | 13,12 | 14,61 | 16,47 | 34,38 | 37,65 | 40,65 | 44,31 | 46,93 |
| 26 | 11,16 | 12,20 | 13,84 | 15,38 | 17,29 | 35,56 | 38,89 | 41,92 | 45,64 | 48,29 |
| 27 | 11,81 | 12,88 | 14,57 | 16,15 | 18,11 | 36,74 | 40,11 | 43,19 | 46,96 | 49,64 |
| 28 | 12,46 | 13,56 | 15,31 | 16,93 | 18,94 | 37,92 | 41,34 | 44,46 | 48,28 | 50,99 |
| 29 | 13,12 | 14,26 | 16,05 | 17,71 | 19,77 | 39,09 | 42,56 | 45,72 | 49,59 | 52,34 |
| 30 | 13,79 | 14,95 | 16,79 | 18,49 | 20,60 | 40,26 | 43,77 | 46,98 | 50,89 | 53,67 |
| 40 | 20,71 | 22,16 | 24,43 | 26,51 | 29,05 | 51,81 | 55,76 | 59,34 | 63,69 | 66,77 |
| 50 | 27,99 | 29,71 | 32,36 | 34,76 | 37,69 | 63,17 | 67,50 | 71,42 | 76,15 | 79,49 |
| 60 | 35,53 | 37,48 | 40,48 | 43,19 | 46,46 | 74,40 | 79,08 | 83,30 | 88,38 | 91,95 |
| 70 | 43,28 | 45,44 | 48,76 | 51,74 | 53,33 | 85,53 | 90,53 | 95,02 | 100,4 | 104,2 |
| 80 | 51,17 | 53,54 | 57,15 | 60,39 | 64,28 | 96,58 | 101,9 | 106,6 | 112,3 | 116,3 |
| 90 | 59,20 | 61,75 | 65,65 | 69,13 | 73,29 | 107,6 | 113,1 | 118,1 | 124,1 | 128,3 |
| 100 | 67,33 | 70,06 | 74,22 | 77,93 | 82,36 | 118,5 | 124,3 | 129,6 | 135,8 | 140,2 |

Tabla A XI.4.
Valores del procedimiento de Dunnett (Miller, 1981)

| Una cola d_k^a | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------------|--------|------|------|------|------|------|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| k v | a=0,05 | | | | | | | | | a=0,1 | | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 |
| 5 | 2,02 | 2,44 | 2,58 | 2,85 | 2,98 | 3,08 | 3,16 | 3,24 | 3,30 | 3,37 | 3,90 | 4,21 | 4,43 | 4,50 | 4,73 | 4,85 | 4,94 | 5,03 |
| 6 | 1,94 | 2,34 | 2,56 | 2,71 | 2,83 | 2,92 | 3,00 | 3,07 | 3,12 | 3,14 | 3,61 | 4,88 | 4,07 | 4,21 | 4,33 | 4,43 | 4,51 | 4,39 |
| 7 | 1,89 | 2,27 | 2,48 | 2,62 | 2,73 | 2,82 | 2,89 | 2,95 | 3,01 | 3,00 | 3,42 | 3,56 | 3,83 | 3,96 | 4,07 | 4,15 | 4,23 | 4,30 |
| 8 | 1,86 | 2,22 | 2,42 | 2,55 | 2,56 | 2,74 | 2,81 | 2,87 | 2,92 | 2,90 | 3,20 | 3,51 | 3,67 | 3,79 | 3,18 | 3,96 | 4,03 | 4,09 |
| 9 | 1,83 | 2,18 | 2,37 | 2,50 | 2,60 | 2,68 | 2,75 | 2,81 | 2,86 | 2,82 | 3,19 | 3,40 | 3,55 | 3,86 | 3,75 | 3,82 | 3,89 | 3,94 |
| 10 | 1,81 | 2,15 | 2,34 | 2,47 | 2,56 | 2,64 | 2,70 | 2,76 | 2,81 | 2,76 | 3,11 | 3,31 | 3,45 | 3,56 | 3,64 | 3,71 | 3,78 | 3,83 |
| 11 | 1,80 | 2,13 | 2,31 | 2,44 | 2,53 | 2,60 | 2,67 | 2,72 | 2,77 | 2,72 | 3,06 | 3,25 | 3,38 | 3,46 | 3,56 | 3,63 | 3,69 | 3,74 |
| 12 | 1,78 | 2,11 | 2,29 | 2,41 | 2,50 | 2,58 | 2,64 | 2,59 | 2,74 | 2,68 | 3,01 | 3,19 | 3,32 | 3,42 | 3,50 | 3,56 | 3,62 | 3,67 |
| 13 | 1,77 | 2,09 | 2,27 | 2,39 | 2,48 | 2,55 | 2,61 | 2,68 | 2,71 | 2,65 | 2,97 | 3,15 | 3,27 | 3,37 | 3,44 | 3,91 | 3,56 | 3,61 |
| 14 | 1,76 | 2,08 | 2,25 | 2,37 | 2,46 | 2,53 | 2,59 | 2,64 | 2,69 | 2,62 | 2,94 | 3,11 | 3,23 | 3,32 | 3,40 | 3,46 | 3,51 | 3,56 |
| 15 | 1,75 | 2,07 | 2,24 | 2,36 | 2,44 | 2,51 | 2,57 | 2,62 | 2,67 | 2,60 | 2,91 | 3,08 | 3,20 | 3,29 | 3,36 | 3,42 | 3,47 | 3,52 |
| 16 | 1,75 | 2,06 | 2,23 | 2,34 | 2,43 | 2,50 | 2,56 | 2,61 | 2,65 | 2,58 | 2,38 | 3,05 | 3,17 | 3,28 | 3,33 | 3,39 | 3,44 | 3,48 |
| 17 | 1,74 | 2,05 | 2,22 | 2,33 | 2,42 | 2,49 | 2,54 | 2,59 | 2,64 | 2,57 | 2,86 | 3,03 | 3,14 | 3,23 | 3,30 | 3,36 | 3,41 | 3,45 |
| 18 | 1,73 | 2,04 | 2,21 | 2,32 | 2,41 | 2,48 | 2,53 | 2,58 | 2,62 | 2,55 | 2,84 | 3,01 | 3,12 | 3,21 | 3,27 | 3,33 | 3,38 | 3,40 |
| 19 | 1,73 | 2,03 | 2,20 | 2,31 | 2,40 | 2,47 | 2,52 | 2,57 | 2,61 | 2,54 | 2,83 | 2,99 | 3,10 | 3,18 | 3,25 | 3,31 | 3,36 | 3,40 |
| 20 | 1,72 | 2,03 | 2,19 | 2,30 | 2,30 | 2,46 | 2,51 | 2,56 | 2,60 | 2,53 | 2,81 | 2,97 | 3,08 | 3,17 | 3,23 | 3,29 | 3,34 | 3,40 |
| 24 | 1,71 | 2,01 | 3,17 | 2,28 | 2,36 | 2,43 | 2,48 | 2,53 | 2,57 | 2,40 | 2,77 | 2,92 | 3,03 | 3,11 | 3,17 | 3,22 | 3,27 | 3,31 |
| 30 | 1,70 | 1,99 | 2,15 | 2,25 | 2,33 | 2,40 | 2,45 | 2,50 | 2,54 | 2,46 | 2,72 | 2,87 | 2,97 | 3,05 | 3,11 | 3,16 | 3,21 | 3,24 |

ANEXO XII. PROTOCOLO DE LIMPIEZA DEL MATERIAL DE ENSAYO

El procedimiento que se describe a continuación se corresponde con el procedimiento de limpieza de material y equipos de laboratorio descrito por la USEPA (Weber, 1993; Lewis *et al.*, 1994; Klemm, 1994). Este procedimiento de lavado se ha utilizado en todos los ensayos de toxicidad y en la mayoría de análisis físico-químicos.

Procedimiento general de lavado

Los recipientes de ensayo y/o almacenamiento de muestra nuevos de material plástico, no necesitan seguir el procedimiento de lavado que se describe a continuación. Es suficiente enjuagar una vez estos recipientes con las muestras o agua de dilución antes de su uso.

El material de vidrio nuevo debe dejarse durante al menos 12 horas en un baño de ácido al 10% (ver abajo) y enjuagarlo posteriormente con agua destilada o agua de dilución.

Todos los recipientes de almacenamiento de muestra, recipientes de ensayo, y otros equipos que hayan estado en contacto con efluentes, aguas receptoras o disoluciones de compuestos específicos deben ser lavados después de su uso con el objeto de quitar todo tipo de contaminantes. Para ello realizar los siguientes pasos:

1. Mantener el material en un baño durante 15 minutos con detergente, o lavar en una máquina especial de lavado de material de laboratorio.
2. Enjuagar dos veces con agua templada.
3. Enjuagar una vez con una disolución de ácido al 10% (v/v) de ácido clorhídrico o nítrico con el objeto de eliminar metales trazas y bases. Para preparar la solución de ácido al 10%, añadir 10 mL de ácido concentrado a 90 mL de agua destilada.
4. Enjuagar dos veces con agua destilada.
5. Enjuagar una vez con fuerza con acetona de grado-pesticida con el objeto de eliminar los compuestos orgánicos.
6. Enjuagar tres veces con agua destilada.
7. En caso posible y justo antes de su uso, enjuagar todo el material con el agua de dilución que se utilice en cada caso o con la muestra de ensayo

Requisitos especiales para el lavado de vidrio utilizado con las microalgas.

1. Todo el material de vidrio se debe lavar con una solución de detergente sin fosfatos, y preferiblemente a un baño a unos 50 °C. Lavar el interior de los frascos con una escobilla de limpieza destinada exclusivamente al lavado de este material, con el objeto de quitar cualquier material pegado al vidrio. Este paso puede ser sustituido con el uso de labadoras de vidrio de laboratorio comerciales.
2. Enjuagar con agua templada.
3. Enjuagar vigorosamente los recipientes de ensayo con acetona y con una solución al 10% de ácido clorhídrico (HCl). Es recomendable mantener el vidrio en una baño de clorhídrico al 10% durante varios días.
4. Los tubos de centrifuga deben mantenerse durante unos minutos en un baño de ácido clorhídrico al 10%. Se recomienda el uso de tubos desechables.
5. Enjuagar dos veces con agua Millipore Milli-Q® o equivalente.

6. Los recipientes de ensayo nuevos y todos los recipientes que se vayan a utilizar que hayan estado en contacto con sustancias orgánicas tóxicas, deben enjuagarse con acetona grado-pesticida o tratarse con calor antes de usarse (horno a 400 °C durante 30 min).
7. Si se ha utilizado acetona, enjuagar vigorosamente con agua Millipore Milli-Q® o equivalente y secar a 105°C.
8. Todo el material de vidrio deberá autoclavarse antes de su uso. Para ellos cubrir la boca de cada recipiente con láminas de aluminio u otros cierres similares (p.e. tapones especiales de microbiología),
9. El uso de pipetas estériles desechables evita la necesidad de lavar, autoclavar material de este tipo, y minimiza la posibilidad de contaminar los cultivos con compuestos tóxicos.
10. Cuando sea posible, los recipientes de ensayo deben enjuagarse con el agua de dilución inmediatamente antes de cada uso

ANEXO XIII. REACTIVOS UTILIZADOS. ABREVIATURAS.**REACTIVOS UTILIZADOS**

| <u>Compuesto</u> | <u>Casa Comercial. Especificaciones</u> |
|---|--|
| ClNa..... | Scharlau, extrapuro, Ph, Eur, USP, BP |
| NaSO ₄ · 10H ₂ O..... | Scharlau, extrapuro, DAB, Ph, Eur, USP, BP |
| KCl..... | Panreac, purísimo |
| KBr..... | Merck, P.A. |
| Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O..... | Panreac, grado reactivo, ACS, ISO |
| MgCl ₂ · H ₂ O..... | Scharlau, extra puro, DAB, Ph, EUR, BP, FCC, USP |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O..... | Scharlau, extra puro, Ph, Eur, USP |
| SrCl ₂ · 6H ₂ O..... | Panreac, purísimo |
| NaHCO ₃ | Panreac, para análisis, ACS, ISO |
| SiNa..... | Scharlau, disolución en agua |
| EDTA· Na ₂ · 2H ₂ O..... | Panreac, para análisis, ACS |
| FeCl ₃ | Scharalu, extra puro |
| NO ₃ Na..... | Panreac, para análisis, ISO |
| PO ₄ H ₂ Na· 2H ₂ O..... | Scharalu, para análisis, ACS |
| SO ₄ Cu· 5 H ₂ O..... | Scharalu, extrapuro, ACS |
| SO ₄ Zn· 7H ₂ O..... | Scharalu, extrapuro, BP, DAB, Ph, Eur, USP |
| Cl ₂ Co· 6 H ₂ O..... | Panreac, para análisis |
| Cl ₂ Mn· 4 H ₂ O..... | Panreac, para análisis, ACS |
| MoO ₄ Na ₂ · 2 H ₂ O..... | Panreac, para análisis, ACS |
| Vitamina B ₁ hidrocloreuro..... | Fluka Biochemika |
| Vitamina B ₁₂ | SIGMA |
| Fenol..... | Scharlau, ACS |
| LAS..... | Fluka Chemie A. G. |
| Tergitol NP-9..... | Fluka Chemie A. G. |
| 1α-2α-3β-4α-6β-HCH (γ-isómero)..... | SIGMA |

ABREVIATURAS/NOMENCLATURAS UTILIZADAS EN LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

| Abreviatura/Nomenclatura | Descripción |
|---|---|
| CF..... | Coliformes fecales |
| EF..... | Estreptococos fecales |
| T..... | Temperatura |
| S..... | Salinidad |
| NH ₄ ó NH ₄ ⁺ ; N-NH ₄ ó N-NH ₄ ⁺ | Amonio (NH ₄ ⁺); Amonio expresado en términos de nitrógeno |
| NO ₂ ó NO ₂ ⁻ ; N-NO ₂ ó N-NO ₂ ⁻ | Nitritos (NO ₂ ⁻); Nitritos expresado en términos de nitrógeno |
| NO ₃ ó NO ₃ ⁻ ; N-NO ₃ ó N-NO ₃ ⁻ | Nitratos (NO ₃ ⁻); Nitratos expresado en términos de nitrógeno |
| PO ₄ ó PO ₄ ³⁻ ; P-PO ₄ ó P-PO ₄ ³⁻ | Fosfatos (PO ₄ ³⁻); Fosfatos expresado en términos de fósforo |
| CT, CI, COT..... | Carbono disuelto total; carbono disuelto inorgánico; carbono disuelto orgánico |
| SS; SV | Sólidos en suspensión; Sólidos volátiles |
| Si-SiO ₄ ó Si-SiO ₄ ²⁻ | Silicatos |
| Cl a; Cl b; Cl c..... | Clorofila a; Clorofila b; Clorofila c |
| LAS..... | Lineal alquil benceno sulfonato sódico |
| NP9EO..... | Nonilfenol nonietoxilado; Tergitol NP-9 |
| C ₆ H ₅ OH ó C ₆ H ₅ OH..... | Fenol |
| Cu..... | Cobre |
| Cd..... | Cadmio |
| Zn..... | Zinc |



UCA

Universidad
de Cádiz

Departamento de Ingeniería Química, Tecnología de Alimentos y
Tecnologías del Medio Ambiente

Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales

Criterios de Calidad Ambiental

Aplicación a Aguas Limitadas del Golfo de Cádiz

María del Carmen Garrido Pérez

Cádiz, Septiembre de 2002



Castillo de Sancti Petri