



UNIVERSIDAD DE CÁDIZ
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR

**DESARROLLO Y APLICACIONES DE UN SIMULADOR DE
MEZCLA DINÁMICA PARA EL ESTUDIO DE LA
REACTIVIDAD QUÍMICA EN ESTUARIOS**

ENRIQUE GARCÍA LUQUE

CÁDIZ, 2002



Esta Tesis Doctoral ha sido realizada dentro del Grupo de Investigación del Plan Andaluz de Investigación *Oceanografía y Contaminación Litoral* (RNM 144). El trabajo experimental se ha financiado a través de los siguientes proyectos CICYT: "Flujos biogeoquímicos de C, N y P en sistemas litorales: Impacto de la acuicultura intensiva y los vertidos residuales urbanos" (REN2001-3577/MAR) y "Biodegradación anaerobia de Sulfonato de Alquilbenceno Lineal (LAS) en sedimentos de sistemas litorales" (REN2001-2980-C02-01/HID).

Memoria presentada por D. Enrique García Luque
para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas

Enrique García Luque

D. ABELARDO GÓMEZ PARRA, Catedrático del Departamento de Química-Física de la Universidad de Cádiz y D. JESÚS M^a. FORJA PAJARES, Profesor Titular del Departamento de Química Física de la Universidad de Cádiz, como sus directores

HACEN CONSTAR:

Que esta Memoria, titulada “**Desarrollo y aplicaciones de un simulador de mezcla dinámica para el estudio de la reactividad química en estuarios**”, presentada por D. Enrique García Luque, resume su trabajo de Tesis Doctoral y, considerando que reúne todos los requisitos legales, autorizan su presentación y defensa para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas por la Universidad de Cádiz.

Cádiz, Septiembre de 2002

Dr. Abelardo Gómez Parra

Dr. Jesús M. Forja Pajares

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas sin cuya desinteresada y valiosa ayuda habría sido ciertamente arduo “rematar” esta Tesis Doctoral. Gracias, por tanto,

A D. Miguel de la Fuente (de AM System S.A.), Ingeniero Electrónico, por su ayuda en el diseño del sistema de control del equipo que se presenta (tanto en el hardware como en el software).

Al Dr. D. Luis Isidoro Romero, del departamento de Ingeniería Química de la UCA, por su ayuda en la interpretación de los resultados obtenidos en los ensayos estímulo-respuesta de los tanques del simulador.

A Dña. Idoia Sáenz, por suministrar parte de sus datos experimentales de concentraciones reales de metales pesados en el estuario del Guadalquivir, que más tarde formaron parte de los resultados de su Tesis de Licenciatura y fueron publicados posteriormente (Gómez-Parra et al., 2000).

Al Dr. D. Francisco Gallart, del Instituto de Ciencias de la Tierra “Jaime Almera” (CSIC), por su ayuda en el cálculo de los caudales con que se hubiera vertido el agua tóxica de Aznalcóllar retenida en Entremuros, en el caso de que ésta se hubiera vertido sin depurar.

Al Dr. D. John Washington, de la United States Environmental Pollution Agency (Athens, Georgia), por su desinteresada ayuda en los cálculos con el modelo de evaluación geoquímico medioambiental “Geochemists’ Workbench 3.0”.

A D. Pablo Antonio Lara, por medir todas las muestras que así lo requerían por Espectrometría de Masas en los Servicios Centrales de la UCA.

A Petroquímica Española S.A. (PETRESA), la empresa que suministró el LAS comercial empleado en los ensayos para estudiar el comportamiento de dicho tensioactivo.

Señor Presidente. Con su permiso.

Agradezco a mis Maestros, el Dr. D. Abelardo Gómez-Parra y el Dr. D. Jesús Forja Pajares, la ayuda, apoyo y estímulo constantes prestados en la consecución de esta Memoria. A lo largo de este tiempo han supuesto todo un espejo de pundonor.

Hace ya algunas temporadas, debuté con picadores, un soleado miércoles en plena Feria de Jerez. Y hoy llega, por fin, el ansiado momento de tomar la Alternativa, también conocida como el "Doctorado" en el argot de la gente del Toro. Día señaladísimo en la profesión, pues es cuando se alcanza el máximo grado en este oficio. Y para ello se requieren un padrino y un testigo. El padrino, está cantado, pues es mucho lo que debo a mi querido amigo Ángel, *"Morenito de Talavera"*. Lástima que no pueda haber dos testigos, pues de esa manera la cosa sería bien sencilla: José Antonio Rubio y Eduardo González *"Mazaquito"*.

A lo largo de todo este tiempo he conocido a magníficos compañeros de oficio y es muy fácil que me deje a alguien atrás en este recordatorio. He alternado con unos y con otros y a todos debo tardes memorables en las que se destapó el *"tarro de las esencias"*. Gracias, por tanto, a Dori (que ya lleva un año de alternativa; toda una Veterana), a Rocío y a Mónica (que están literalmente "en capilla"), a Víctor, a Carola (aunque se cortara la coleta en el celeberrimo coso de Palmones), a Inma (qué habría hecho yo sin ti todos estos años), a Idoia, a Merche, a Loli, a Martín, a PabliK, a Vivian, a Carmen, a Manolo Manzano (¡santo varón!) y a Manolo Fernández ("quien no ha visto Toros en El Puerto...").

A un matador cabal, lo distingue su Vergüenza Torera. Si alguien me ha enseñado con obras el significado de tal actitud, ése es D. José Antonio Perales Vargas-Machuca.

Tampoco puedo olvidarme de otra gran Cuadrilla; la que integran Julián Blasco, Miguel de Frutos, Ruchi, Isabel, Luis Lubián....y, el más artista de todos, Pablito Vidal. No en balde es paisano de Paquirri.

¿Qué puede decir uno mismo de su Mozo de Estoques?! Es el hombre de confianza, la mano derecha, el mejor amigo. Víctor, "cantabrón", gracias por acompañarme cada tarde con tu maravillosa filosofía y con tu relajante "tranquilo, Maestro, que aquí no pasa ná".

Mención aparte merece la Sagrada Hermandad y Cofradía de los Adalides del Estoque (Don Luis, Don Carlos, Don Ignacio, Sr. Bey, Doña Carmen...son muchos), quienes, durante tres largas temporadas, me han estado ejercitando en el noble arte de la estocada, que no del "sablazo"...

Aunque suene a frase hecha, un torero se debe a su afición. Y, sin merecerlo, tengo el honor de contar con una *DE ORO*. No en balde Córdoba sigue siendo plaza *de primera*: Agustín, Gonzalo, Paco, Antonio, Miguel y todas las Churras (a cual más guapa). Sevilla también cuenta con un precioso coso, y muy serio: Marta de Pablos y Ana (sí, la Summers). Y, aunque actualmente en Cádiz no haya plaza, la hubo, y bien bonita: Miguel, Manué, Félix, Chollín, Sergio, Juan “el Grande”...la culpa es vuestra por bautizarme “*Frascuero*”.

Y, para seguidora número uno, la Serrana de mi Copla, Laurita La Piconera. Te debo mucho esta última y sufrida temporada. Gracias de corazón por todo, *morena de verde luna*...

Me consta que a mi primo PacoPepe le fascinaba todo lo relacionado con este mundillo. Tantas horas hemos hablado de ello... y, aunque se nos quedó mucho en el tintero, nos entendimos siempre a la perfección. Un fortísimo abrazo, querido Paco, ¡*TORERO!*

No, no me olvidé de vosotros. Milan, M^a Carmen y los “niñatos” (ya no tan niños). ¡¡Os debo tanto!!...más de lo que os creéis.

Y ya ha llegado el momento de desmonterarme, en señal de sentimiento y gratitud supremas, ante mis verdaderos Apoderados, los “capitalistas” (morales y pecuniarios) del tinglao: Papá, Mamá, Javier y Ángel (dos *monstruos* de hermanos), y las Abuelas. Jamás se opusieron a que eligiera este –tan ingrato a veces– oficio. Siempre me han apoyado *incondicionalmente*, por mala que se diera la tarde. Y me han enseñado a descubrir lo que realmente tiene valor en la vida. Casi ná.

En fin que, como siga brindando este Toro (un morlaco de nombre “Tesis”. 612 Kilos. Negro, bragao, veleteo y astifino), me lo devuelven vivo a los corrales porque agoto los tres avisos...

Así que sólo me resta por decir que.....

¡¡VA POR USTEDES!!!

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
<i>Introducción</i>	3
<i>Objetivos</i>	6
2. DESCRIPCIÓN Y PRESTACIONES DEL DISPOSITIVO DISEÑADO PARA LA SIMULACIÓN	13
2.1. Introducción	15
2.1.1. Base conceptual de la simulación	15
2.1.2. Aspectos prácticos del diseño del simulador	19
Dimensiones del equipo	19
Caudales entre los distintos tanques	20
Tipo de estuario que puede simularse	20
Tipo de simulación que puede realizarse	21
2.2. Dispositivo experimental	23
2.2.1. Descripción del equipo	23
2.2.2. Pruebas de funcionamiento	28
Control de temperatura y caudales	28
Grado de aproximación a un estuario verticalmente homogéneo	36
Control del grado de mezcla en los distintos tanques del estuario mediante el uso de distintos índices de mezcla	38
2.3. Alternativas para la simulación del proceso de mezcla estuárica	43
2.3.1. Simulación en régimen estacionario	43
2.3.2. Simulación de la acción de las mareas	44
Futuras mejoras de las prestaciones del equipo	47
2.4. Ensayos de simulación realizados	49
Estrategia de muestreo	58
2.5. Bibliografía	60

3. COMPORTAMIENTO DEL SISTEMA DEL CARBONO INORGÁNICO EN ESTUARIOS	63
3.1. Introducción	65
3.1.1. El sistema del carbono inorgánico en el agua de mar	65
3.1.2. Cálculo de la especiación del sistema del carbono inorgánico	67
3.1.3. Ciclo del CO ₂ en zonas costeras	70
3.2. Material y Métodos	73
3.2.1. Determinación de la presión parcial de CO ₂ en el agua	73
3.2.2. Determinación de la presión parcial de CO ₂ en el aire	73
3.2.3. Ensayos realizados	76
3.3. Resultados y Discusión	77
3.3.1. Comportamiento del sistema del carbono inorgánico en el agua del estuario	77
Régimen estacionario	77
Régimen mareal	82
3.3.2. Medida del flujo de CO ₂ agua-atmósfera	84
3.3.3. Flujos de CO ₂ agua-atmósfera	92
Régimen estacionario	92
Régimen mareal	98
Cálculo de coeficientes de transferencia	103
3. 4. Bibliografía	106
4. COMPORTAMIENTO DE NUTRIENTES EN ESTUARIOS	111
4.1. Introducción	113
4.1.1. Reactividad del fósforo inorgánico en sistemas estuáricos	116
Especiación del fósforo	116
Comportamiento del fósforo en la mezcla estuárica	118
4.2. Material y Métodos	123
4.2.1. Análisis de nutrientes	123
4.2.2. Especiación del fosfato	123

4.2.3. Ensayos realizados	124
4.3. Resultados y Discusión	125
4.3.1. Comportamiento de nutrientes	125
4.3.2. Reactividad del fósforo inorgánico en estuarios	128
Influencia de la salinidad en la reactividad del fosfato	128
Influencia del pH en la reactividad del fosfato	143
4.4. Bibliografía	152
5. COMPORTAMIENTO DE METALES PESADOS EN EL ESTUARIO DEL GUADALQUIVIR TRAS EL ACCIDENTE DE AZNALCÓLLAR	162
5.1. Introducción	163
5.2. Material y Métodos	167
5.2.1. Métodos analíticos	167
Determinación de metales	167
5.2.2. Ensayos Realizados	168
5.3. Resultados y Discusión	170
5.3.1. Aplicabilidad de la simulación al estuario del Guadalquivir	170
5.3.2. Comportamiento de metales	172
Especiación de metales	179
5.4. Bibliografía	187
6. EFECTOS BIOLÓGICOS DE METALES PESADOS EN AMBIENTES ESTUÁRICOS	191
6.1. Introducción	193
6.1.1. Especie empleada en el bioensayo: bivalvo <i>Scrobicularia plana</i>	193
6.1.2. Metales pesados	194
6.1.3. Biomarcadores de contaminación: Metalotioneínas	197
6.2. Material y Métodos	198
6.2.1. Métodos analíticos	198
Análisis de metalotioneínas	198
Análisis de proteínas totales	200
Determinación de factores de bioacumulación	200

6.2.2. Manipulación de organismos	201
6.2.3. Ensayos realizados	202
6.3. Resultados y Discusión	202
6.3.1. Metales disueltos	202
6.3.2. Bioacumulación	205
6.3.3. Metalotioneínas	208
6.3.4. Análisis Multivariante: Análisis Factorial	210
6.4. Bibliografía	216
7. COMPORTAMIENTO DE SULFONATOS DE ALQUILBENCENO LINEAL (LAS) Y DE SUS INTERMEDIOS DE DEGRADACIÓN (SPC) EN ESTUARIOS	223
7.1. Introducción	225
7.1.1. LAS y SPC. Estructura	225
7.1.2. Propiedades quimicofísicas de LAS	226
7.1.3. Comportamiento de LAS en estuarios	228
7.1.4. Biodegradación de LAS	232
Mecanismo de biodegradación del LAS	232
Estudios de biodegradación en laboratorio	233
7.1.5. Adsorción de LAS	234
7.2. Material y Métodos	235
7.2.1. LAS comercial empleado	235
7.2.2. Métodos analíticos	235
Análisis de LAS y SPC por HPLC	235
Pretratamiento de las muestras sólidas (extracción SOXHLET)	236
Extracción en fase sólida	236
Espectrometría de masas	237
7.2.3. Ensayos realizados	238
7.3. Resultados y Discusión	238
7.3.1. Optimización del diseño experimental	238
7.3.2. Ensayos de Biodegradación de LAS	242
Comportamiento del LAS	242

Comportamiento de los SPC	245
7.3.3. Ensayos de Biodegradación y Adsorción de LAS	248
Comportamiento del LAS	248
Comportamiento de los SPC	251
7.4. Bibliografía	253
8. CONCLUSIONES	259
<i>Conclusiones</i>	261

RELACIÓN DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS USADOS EN ESTA MEMORIA

δ	espesor de la interfase aire-agua
Ω	índice de saturación
α	solubilidad de un gas en agua
C ₁₈	octadecilsílice
CID	carbono inorgánico disuelto
FLD	detector de fluorescencia
HMDE	electrodo de gota de mercurio colgante
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
I	fuerza iónica
IAP	producto de actividad iónica
IRGA	analizador de gases por infrarrojos
k	coeficiente de transferencia de un gas a través de la interfase aire-agua
K	ganancia, banda proporcional. Relacionado con la "teoría de control".
K _D	coeficiente de partición (o de distribución) entre dos fases
K _{OW}	coeficiente de partición octanol-agua
LAS	sulfonato/s de alquilbenceno lineal
MS	detector de espectrometría de masas
MTs	metalotioneínas
NBS	oficina nacional de estándares
NID	nitrógeno inorgánico disuelto
O.D.	oxígeno disuelto
PID	fósforo inorgánico disuelto
Q ₀	caudal de entrada del río al simulador
Q _i	caudal suministrado por la bomba "i" (perteneciente al tanque "i")
Q _M	caudal de entrada del mar al simulador
S.A.D.	sistema de adquisición de datos
S.S.	sólidos en suspensión
S ₀	salinidad del agua de río
SAX	intercambio aniónico fuerte
SD	desviación estándar
S _i	salinidad del agua del tanque "i"

SIES	acróstico de Simulador de ESTuarios (denominación de los distintos experimentos realizados)
S_M	salinidad del agua de mar
SMDE	electrodo de gota de mercurio estática
SPC	ácido/s sulfonilcarboxílico/s
T_d	tiempo derivativo. Relacionado con la "teoría de control"
T_i	tiempo integral, tiempo de reajuste. Relacionado con la "teoría de control"

1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

Los estuarios son el nexo de unión de las aguas continentales y oceánicas y constituyen, en consecuencia, la vía de acceso al mar de gran cantidad de sustancias particuladas y disueltas procedentes del drenaje terrestre. Desde un punto de vista químico, constituyen una de las zonas más complejas de la hidrosfera, ya que en ellos se producen, en espacio muy reducido, las mayores variaciones de la composición y de las propiedades fisicoquímicas del medio que se registran en las aguas superficiales.

La aparición de estos gradientes en las características ambientales induce, para numerosos compuestos químicos aportados por las aguas del río o del mar, una elevada reactividad que, con frecuencia, provoca un comportamiento no conservativo de esas sustancias en su tránsito a lo largo del estuario. Ese comportamiento no conservativo, que implica el paso de la fase disuelta a la particulada, hace que muchos compuestos inicialmente en disolución puedan quedar retenidos en los sedimentos en las zonas de menor energía de los estuarios. Por este motivo, puede considerarse que estos gradientes generados -especialmente de fuerza iónica, de pH y de potencial redox- constituyen una "barrera química" que provoca que los estuarios actúen como sumideros para un gran número de elementos y compuestos orgánicos e inorgánicos procedentes de los continentes. Así, y a pesar de su reducido tamaño, estos sistemas condicionan la biodisponibilidad y el comportamiento biogeoquímico de dichos compuestos en amplias zonas del litoral y, en último término, llegan a controlar el tiempo de residencia que tienen a escala oceánica.

Además, los estuarios han sido históricamente lugares preferentes para los asentamientos urbanos e industriales y, también, importantes vías de comunicación. Todo ello ha provocado que en la actualidad estén sometidos a una fuerte contaminación y a una importante modificación de su hidrodinámica y de su patrón de mezcla estuárica como consecuencia de los dragados, las canalizaciones, la construcción de puentes e infraestructuras portuarias, etc, a las que con frecuencia se ven sometidos. Esto se produce, por otra parte, en unas zonas especialmente sensibles desde un punto de vista ecológico, ya que los estuarios se caracterizan por tener una elevada biomasa y diversidad, constituyen los lugares de puesta de un gran número de especies marinas y, generalmente, están sometidos a una intensa explotación de sus recursos biológicos.

Ambas circunstancias, su papel regulador de los ciclos biogeoquímicos globales de muchas sustancias químicas y los problemas derivados de la fuerte influencia

antropogénica a la que están sujetos, han hecho que, desde hace décadas, se hayan desarrollado numerosos programas de investigación en los que se ha abordado el estudio del régimen hidrodinámico de los estuarios y del comportamiento ambiental de las sustancias químicas que acceden a ellos. Estos estudios han generado una amplia base de datos difícil de sistematizar. De hecho, las monografías existentes sobre la química de estuarios suelen limitarse a cuestiones referentes a su clasificación, en función al patrón de mezcla al que están sujetos, a aspectos relacionados con la logística de su muestreo y, en la mayor parte de los casos, a cuestiones ajenas a la reactividad química, tales como la cuantificación de la contaminación que soportan los estuarios o a temas que tienen que ver más con la ecología. Acerca del comportamiento de las sustancias químicas en los estuarios, sólo se dispone de una visión descriptiva, desagregada y, a veces, contradictoria de su evolución a lo largo del gradiente de salinidad que existe entre las aguas continentales y el mar.

Este estado de cosas está provocado por el elevado número de factores que afectan a la reactividad de una especie química dada. Además de un cambio progresivo de la fuerza iónica del medio, en cada estuario se dan valores diferentes del pH, del potencial redox, de la temperatura, de la concentración de especies complejantes o formadoras de asociaciones iónicas, de la cantidad de superficie disponible para la adsorción o el intercambio iónico (dada por el contenido en sólidos en suspensión y su naturaleza), de la presencia y concentración de coloides y de la densidad de la biota, entre otros. Estas variables ambientales experimentan además fuertes cambios estacionales y espaciales que dependen de las características meteorológicas y climáticas de la cuenca de drenaje, de la fisiografía del estuario y de las condiciones oceanográficas de la zona marina en que está situado. En estuarios situados en latitudes extremas, se producen también cambios de fase en el agua líquida como consecuencia de la evaporación o la congelación, que afectan drásticamente a la composición del medio. La acción conjunta de todos estos factores y los efectos sinérgicos o antagónicos que pueden provocar, hacen que cada estuario constituya un medio ambiente único, por lo que la información obtenida en cada uno de ellos es difícilmente extrapolable a los demás e, incluso, difícilmente comparable. Un problema añadido en el estudio de los estuarios se debe a la dificultad de realizar muestreos sinópticos o cuasi-sinópticos, ya que el ritmo mareal es del mismo orden de magnitud que el tiempo requerido para la toma de muestra en el estuario. Además, su escasa profundidad obliga en muchos casos a operar con embarcaciones con un equipamiento muy inferior al que se dispone en los buques oceanográficos. Esto obliga, entre otras cuestiones, a reducir el número de variables que

se miden y a realizar el tratamiento o el análisis de las muestras en un plazo superior al deseable, lo que repercute en su exactitud.

El estudio de un medio tan complejo como el que constituyen los estuarios puede verse facilitado si se recurre a la simulación de los procesos que tienen lugar en ellos. Simulando el proceso de mezcla estuárica de cuerpos de agua bien caracterizados y manteniendo constantes cuantas variables se deseen, podrían obtenerse relaciones simples entre la reactividad de una sustancia dada y los valores de una variable concreta y, en un estadio posterior, los efectos concomitantes de dos o más variables.

Además del control de las propiedades del medio, la simulación ofrece otras ventajas adicionales, como por ejemplo:

- Permite reducir el tiempo necesario para establecer la dependencia de un proceso determinado con una variable que tiene un ritmo de variación lento. Este es, por ejemplo, el caso de la temperatura o el caudal de agua aportado por los ríos tributarios, que tienen una variación estacional.
- Hace posible establecer, *a priori*, el comportamiento en los estuarios de sustancias sintéticas antes de ser utilizadas y, por tanto, con anterioridad a su acceso al medio ambiente. Esta práctica, de realizarse, podría cambiar sustancialmente el enfoque de muchas evaluaciones de impacto ambiental.
- Puede ayudar a la gestión ambiental de las zonas estuáricas ensayando soluciones alternativas excluyentes para evaluar la eficacia de cada una de ellas ante un problema, real o hipotético, de contaminación. En el primer caso, permitiría adoptar la opción más adecuada y, en el segundo, aumentar la capacidad de respuesta ante eventuales accidentes que precisen de una acción inmediata.

A pesar de su interés, hasta el momento son escasos los artículos en los que se han descrito experimentos de simulación de la reactividad química en estuarios y, en los casos en los que se ha realizado, o bien se utilizan dispositivos con volúmenes pequeños o el procedimiento empleado no permitía mantener indefinidamente el gradiente de salinidad que existe en los estuarios reales.

Esta Tesis Doctoral, cuyos resultados se resumen en la presente Memoria, se proyectó de manera que se cubrieran los siguientes **OBJETIVOS**:

1. Diseñar un dispositivo para reproducir, de manera dinámica, a escala de laboratorio, el proceso de mezcla de las aguas continentales y marinas en estuarios verticalmente homogéneos. Se pretendía que el equipo cumpliera los siguientes requisitos.
 - 1.1. Que permitiera realizar la simulación tanto en régimen estacionario como incluyendo el efecto de las mareas.
 - 1.2. Que fuera posible reproducir cualquier gradiente longitudinal de salinidad, régimen mareal y tiempos de residencia existente en los estuarios reales.
 - 1.3. Que el control de funcionamiento del equipo fuera automático.
2. Construir un prototipo del simulador para el estudio de la reactividad química que tiene lugar en los estuarios, a una escala suficiente como para permitir la estabulación de organismos acuáticos y con unas características que hicieran posible cuantificar la transferencia de gases entre el agua y la atmósfera.
3. Aplicar el dispositivo construido al estudio de la reactividad en los estuarios de una selección de sustancias químicas realizada de manera que se contemplaran procesos diferentes que tuvieran lugar bajo distintas condiciones ambientales. De entre las numerosas posibilidades existentes, se eligieron las siguientes:
 - 3.1. Caracterizar la evolución del sistema del carbono inorgánico en un medio sometido a una fuerte variación de la fuerza iónica y el pH y medir los flujos de dióxido de carbono resultantes entre la lámina de agua y la atmósfera.
 - 3.2. Determinar la reactividad de nutrientes durante el proceso de mezcla estuárica, incidiendo especialmente en la constatación de la formación de apatitos a partir del fósforo inorgánico disuelto.
 - 3.3. Simular los efectos en un estuario de un evento de contaminación aguda por metales pesados.

- 3.4. Establecer la tasa de bioacumulación de determinados metales (Zn, Cd, Pb y Cu) y algunos de sus efectos subletales sobre un molusco bivalvo sometido a diferentes salinidades.
- 3.5. Estudiar el comportamiento de un tensioactivo aniónico sintético durante su tránsito por un estuario.

La organización de esta Memoria se ha realizado presentando y discutiendo los resultados obtenidos en la Tesis en el mismo orden en el que se han enumerado los objetivos propuestos. Así, tras esta introducción, en el Capítulo 2 se hace una descripción detallada de todas las cuestiones relacionadas con el diseño y la construcción del simulador de estuarios y de sus prestaciones. El capítulo comienza exponiendo la base conceptual en la que se fundamenta la simulación y discutiendo diversos aspectos prácticos que deben abordarse con anterioridad a la construcción del equipo. Posteriormente se desarrollan los algoritmos de cálculo que permiten reproducir los gradientes longitudinales y los tiempos de residencia establecidos y, en su caso, el régimen mareal al que está sujeto el estuario que se pretende simular. El capítulo finaliza con una descripción detallada de todos los ensayos de simulación realizados. En muchos casos, un mismo experimento se utilizó para estudiar simultáneamente varios de los procesos involucrados en los objetivos 3.1. a 3.5.; por ese motivo, para facilitar la lectura de la Memoria, se incluye como “señala-páginas” una relación de todos los ensayos realizados en el que se indica para cada uno de ellos el tipo de simulación realizado y las condiciones de simulación utilizadas.

En los capítulos siguientes, del tercero al séptimo, se discuten separadamente los resultados obtenidos en los distintos experimentos realizados para estudiar los procesos involucrados en los objetivos 3.1. a 3.5. Con objeto de facilitar su localización, la bibliografía utilizada específicamente en cada capítulo se ha indicado al final de cada uno de ellos. No obstante, las conclusiones obtenidas en todos ellos se presentan de manera conjunta en el capítulo octavo. A modo de justificación de la selección que se hizo, en lo que sigue se esbozan algunas ideas que pueden ilustrar acerca de la trascendencia ambiental de los procesos reproducidos en el simulador.

En concreto, en el Capítulo 3, se resume el trabajo experimental que tiene por objeto contribuir al conocimiento de la dinámica del carbono inorgánico en los sistemas estuáricos, fundamentalmente en lo que se refiere al intercambio entre dos de los principales compartimentos ambientales (el agua y la atmósfera).

El CO₂ es un gas con efecto invernadero, por lo que su intercambio aire-agua supone una cuestión importante en el estudio del cambio climático. La parte más costera del océano (en la que se incluyen los estuarios), que comprende un área pequeña pero que experimenta unos importantes flujos atmosféricos de CO₂, juega un papel muy importante a la hora de determinar si el océano en su conjunto es autotrófico o heterotrófico. Debido a todo esto, los flujos, fuentes y mecanismos de transporte y transformación de CO₂ se encuentran entre los temas actuales más importantes en el estudio de la biogeoquímica de los sistemas marinos y continentales. Sin embargo, aún existe poco conocimiento de las fuentes más importantes (además de las fluviales) y de los procesos que determinan los flujos de carbono inorgánico a la zona costera del océano.

El aumento paulatino de la concentración de CO₂ en la atmósfera, así como los importantes cambios que está introduciendo en el clima de la Tierra, ha provocado en los últimos años un estudio intenso del ciclo global del carbono. De hecho, el establecimiento del ciclo del carbono inorgánico en los sistemas marinos es uno de los proyectos más ambiciosos que actualmente se desarrolla por varios programas de observación. Dentro del ciclo global del carbono, tienen un especial interés las zonas costeras (entre las que se incluyen los estuarios). De ahí el interés por establecer en el Capítulo 3 el comportamiento del carbono inorgánico en los estuarios que se han simulado, así como el cálculo de los flujos de CO₂ agua-atmósfera en un número importante de los ensayos realizados.

Por otro lado, los sistemas estuáricos se caracterizan por su elevada productividad asociada, entre otros factores, a la disponibilidad de nutrientes. En el ciclo natural, existe un rápido reciclaje de nitrógeno y fósforo desde el sedimento, consecuencia de la mineralización de la materia orgánica. En las últimas décadas, la actividad antropogénica está afectando a los flujos de entrada de estos elementos desde los ríos y otras zonas costeras, bien aumentando los aportes directos de dichos nutrientes o bien debido a la acumulación de materia orgánica antropogénica.

En último término, los océanos son los receptores de los elementos nutrientes y la principal vía de acceso de éstos se produce a través de los estuarios. Por tanto, y a pesar de su reducido tamaño en comparación con los océanos, estos sistemas condicionan la biodisponibilidad y el comportamiento biogeoquímico de dichos nutrientes en amplias zonas del litoral. De ahí la importancia de determinar la reactividad de los nutrientes durante el proceso de mezcla estuárica. De hecho, el trabajo experimental que se resume en el Capítulo 4 tiene por objeto caracterizar dicha reactividad, haciendo hincapié

especialmente en la constatación de la formación de apatitos a partir del fósforo inorgánico disuelto, cuyo comportamiento se ha estudiado con mayor profundidad al ser el nutriente más reactivo.

Otro de los objetivos propuestos en esta Memoria ha sido el de simular, en un estuario, los efectos de un evento de contaminación aguda por metales pesados. Durante el desarrollo del trabajo experimental de la Tesis Doctoral que se resume en esta Memoria, se produjo la rotura de la balsa de residuos mineros de la empresa Bolidem-Apirsa en Aznalcóllar que produjo el episodio de contaminación aguda por metales pesados más grave que ha sufrido el entorno de Doñana y uno de los más importantes a escala mundial.

Por este motivo, dada la repercusión social que produjo el suceso por el elevado valor ecológico de la zona afectada, se decidió utilizar toda la información recabada a consecuencia del accidente para simular un episodio agudo de contaminación por metales pesados y, sobre todo, para verificar una de las hipótesis barajadas en este trabajo: la posibilidad de utilizar la simulación como una herramienta eficaz en la gestión ambiental. Como se describe con detalle en el Capítulo 5, sólo una parte de las aguas ácidas de mina que se vertieron como consecuencia de la rotura de la balsa que contenía estos desechos mineros alcanzó el estuario del Guadalquivir. El resto, unos cinco millones de metros cúbicos, quedó retenido en sus proximidades por medio de unos precarios muros de contención que se construyeron de forma improvisada. Esta situación planteó una disyuntiva a los responsables regionales del medio ambiente, ya que se consideraban dos posibles actuaciones que eran excluyentes: i) depurar el agua tóxica retenida antes de su vertido al Guadalquivir y ii) verterla de manera progresiva y programada al estuario. Ambas alternativas tenían sus pros y sus contras. Así, la primera –más acorde con los criterios conservacionistas– implicaba la construcción de una depuradora de coste muy elevado en un plazo de tiempo demasiado corto, ya que las previsibles lluvias que podrían producirse en los meses próximos podrían provocar la rotura de los muros de contención y verter de manera incontrolada el agua tóxica en el estuario. La segunda opción era más pragmática y consistía en drenar o bombear al estuario cantidades preestablecidas del agua tóxica aprovechando las mareas de mayor coeficiente y la capacidad de regular el caudal del Guadalquivir por medio de la presa de Alcalá, que es la más próxima a su desembocadura. Esta actuación evitaba los riesgos de la opción anterior aunque hubiera podido provocar unos efectos en el estuario difícilmente predecibles.

Sin entrar a considerar la idoneidad de la alternativa adoptada (la construcción de la depuradora), ni los motivos por los que se tomó esa decisión, parece evidente que el haber dispuesto de un procedimiento que evaluase *a priori* las consecuencias de todas las opciones posibles hubiera permitido elegir en su momento la solución más eficaz de una manera más objetiva.

Por otra parte, la biota residente en un estuario puede verse muy afectada por la contaminación, ya sea episódica o crónica, por metales pesados. Muchos de estos elementos tienen una elevada tendencia a formar complejos con sustancias orgánicas y, por tanto, a ser fijados en los tejidos de los organismos y a no ser excretados. En consecuencia su tiempo de vida media es largo. Este hecho constituye probablemente uno de los principales problemas asociados a su toxicidad y afecta especialmente a los organismos sedentarios, como los bivalvos. Los moluscos bivalvos son especies filtradoras que obtienen su alimento sifonando el agua circundante, por lo que pueden bioacumular grandes cantidades de metales pesados si estos se encuentran presentes en el agua en la que viven. La mayoría de los moluscos bivalvos tienen gran interés comercial ya que se emplean para el consumo humano. La actividad antropogénica ha contribuido a aumentar considerablemente la concentración de metales en el medio marino y, desde los primeros casos graves de intoxicación por metales pesados que fueron detectados a finales de los años 50 y en los 60, se han realizado innumerables estudios para determinar, por medio de bioensayos, tanto el grado de bioacumulación de distintos metales sobre un gran número de organismos, como las velocidades de incorporación y detoxificación. En el Capítulo 6 se presenta el trabajo realizado para determinar el grado de bioacumulación de cuatro metales pesados (Zn, Cd, Pb y Cu) sobre ejemplares del bivalvo *Scrobicularia plana* sometidos simultáneamente a un gradiente de la concentración de metales pesados y de la salinidad. Complementariamente, como una medida de los efectos subletales provocados, se determinó en los organismos estabulados en el simulador el contenido en proteínas totales y la concentración de metalotioneínas tras la exposición.

Y para finalizar, el trabajo experimental que se resume en el Capítulo 7 se encuadra dentro del creciente interés existente acerca del establecimiento del comportamiento ambiental (transporte, distribución y transformación) de los compuestos orgánicos de síntesis. Concretamente, el estudio se ha realizado sobre los sulfonatos de alquilbenceno lineal (LAS), que son los tensioactivos aniónicos de mayor uso en los detergentes domésticos e industriales, y sobre sus intermedios de degradación, los ácidos

sulfonilcarboxílicos (SPC). El sulfonato de alquilbenceno lineal es, con un 12% del total del consumo mundial de tensioactivos, el más usado en la formulación de detergentes. El estudio se ha centrado en los procesos de adsorción y degradación que puede sufrir el LAS en su tránsito por los estuarios, al formar parte de los efluentes urbanos e industriales que acceden al océano procedentes de los ríos generalmente a través de dichos estuarios.

2. DESCRIPCIÓN Y PRESTACIONES DEL EQUIPO DISEÑADO PARA LA SIMULACIÓN

2.1.INTRODUCCIÓN

2.1.1. Base conceptual de la simulación

La simulación en el laboratorio de la reactividad de una sustancia dada, inducida por la variación de la fuerza iónica y de otras propiedades fisicoquímicas en su tránsito por un estuario, puede abordarse de dos maneras diferentes:

- a) De manera *estática*, mezclando en diferentes recipientes las cantidades adecuadas de agua de mar y de río para obtener salinidades correspondientes al gradiente longitudinal que presenta el estuario que se desea estudiar.
- b) De manera *dinámica*, mezclando de manera continua y progresiva el agua de mar y de río.

El primer procedimiento es muy simple y, aunque ha sido utilizado por numerosos autores (e.g. Preston y Riley, 1982; Bilinski et al., 1991; Turner et al., 1993; Chung-Chi Chen y Petersen, 2000), presenta como principal objeción el que no reproduce de manera realista la forma en que se realiza el proceso de mezcla estuárica. En la naturaleza esta mezcla tiene lugar de manera continua, por lo que una especie química dada –ya sea aportada por el río o por el mar- está sometida a una variación continua de las propiedades del medio, sobre todo de la salinidad. De esta forma, su reactividad en un lugar dado está determinada por el tiempo que ha permanecido con anterioridad en unas condiciones ambientales que han ido variando de manera *cuasi* infinitesimal.

La segunda aproximación requiere, en rigor, la construcción de una reproducción a escala del estuario estudiado. Esta solución se adopta con frecuencia para el ensayo del impacto de obras de ingeniería (dragados y construcción de puertos y espigones, entre otras) en el régimen hidrodinámico de los estuarios y de otros sistemas costeros. No obstante, con estos simuladores hidráulicos, se requeriría modificar la naturaleza de la fase líquida para que determinadas propiedades físicas, como la densidad y la viscosidad, se adecuen a las dimensiones del simulador. Al margen del coste que supone esta alternativa, en esas condiciones es imposible reproducir la reactividad química que se produce como consecuencia de la mezcla estuárica.

Una aproximación a este tipo de simulación, que tiene un bajo coste, es la que realizaron Smith y Longmore (1980) adicionando de manera continua agua de mar a un volumen

determinado de agua de río. Con ello se consigue una variación progresiva de la salinidad tan lenta como se desee. No obstante, este procedimiento posee como principal objeción el que, al variar la salinidad continuamente, la repetición de un análisis a una salinidad dada implicaría el tener que repetir todo el experimento. Además, operando de esta manera, no puede incluirse a la biota en la experimentación.

Una solución intermedia consiste en mezclar en contracorriente agua de mar y de río a través de sucesivos tanques como se indica en la figura 2.1.

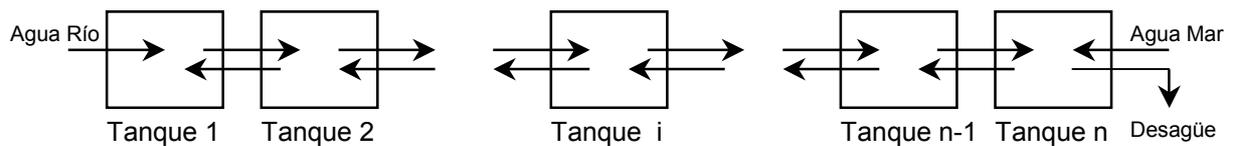


Figura 2.1. Representación esquemática de la mezcla en contracorriente de agua de río y de mar para reproducir el gradiente longitudinal de salinidad de un estuario.

El tanque 1 representaría el límite de la intrusión salina en el estuario. El desagüe del tanque n se requiere para mantener en la simulación la idea de que el entorno marino del estuario es lo suficientemente grande como para asegurar que la composición del agua de mar que entra con la marea creciente no está afectada por el vertido del propio estuario.

Como se indica en la figura 2.2., un dispositivo de esta naturaleza haría que el gradiente continuo de salinidad a lo largo del eje longitudinal del estuario fuera simulado por una serie de tramos de salinidad constante que variarían de manera brusca al pasar de un tanque al siguiente.

Las salinidades de los distintos tanques del simulador pueden elegirse libremente, de manera que se adapten al gradiente real del estuario que se pretende reproducir. De igual manera, puede elegirse la longitud de cada tramo del estuario real que se va a hacer corresponder con un tanque dado del simulador. Esto implica que los volúmenes de los tanques han de guardar entre sí la misma relación de proporcionalidad que tienen los tramos seleccionados, con objeto de poder simular el tiempo de flujo (o de residencia) del agua de río a lo largo del estuario.

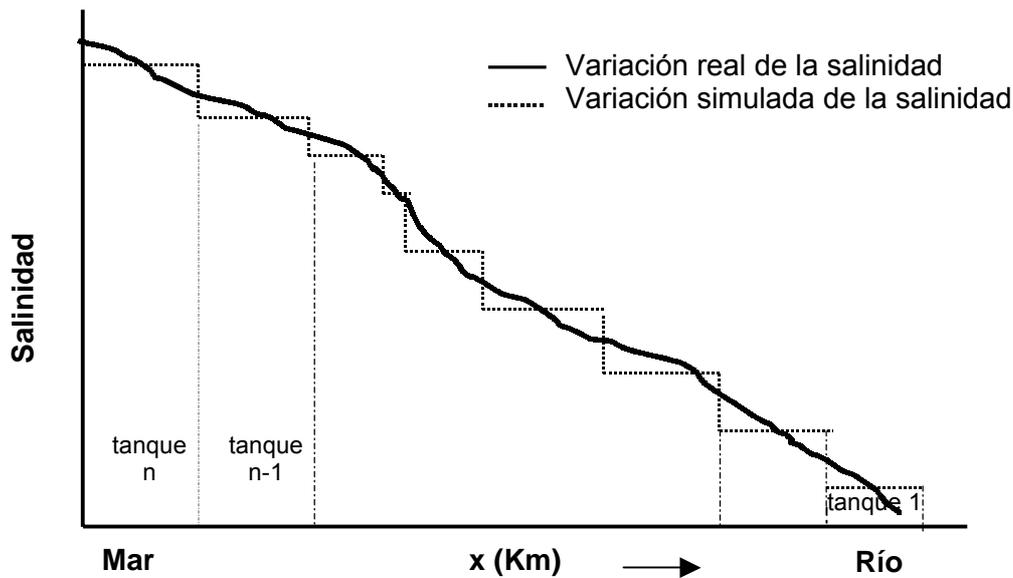


Figura 2.2. Simulación del gradiente longitudinal de salinidad en un estuario hipotético. La variable “x” representa la distancia desde uno de los límites del estuario (en este caso, el límite marino).

Para cada tanque, el tiempo de flujo vendrá dado por:

$$T = \frac{V_i}{Q_0} \cdot \left(1 - \frac{S_i}{S_M}\right) \quad [1]$$

donde V_i es el volumen del tanque “i”, Q_0 , el caudal que simula el del río, S_i , la salinidad del tanque “i” y S_M es la salinidad del agua de mar que entra en el simulador (figura 2.1.). El tiempo de flujo acumulado desde el límite fluvial del estuario (tanque 1) hasta el tramo representado por el tanque “i”, vendrá dado por:

$$T = \frac{1}{Q_0} \cdot \sum_{j=1}^i V_j \cdot \left(1 - \frac{S_j}{S_M}\right) \quad [2]$$

Donde Q_0 está determinado por los valores que se establezcan para S_i y el caudal Q_M de agua de mar que entra en el simulador y pudiendo modificarse tan sólo V_i para establecer los tiempos de residencia.

A una variación de salinidad como la que se consigue con una simulación realizada de esta forma podría objetársele, lo mismo que a la simulación de manera estática, el hecho de que una sustancia dada se vería sometida a una variación no continua de la salinidad

cuando pasara de un tanque a otro. No obstante, esta limitación, que es inherente a este diseño experimental, puede reducirse notablemente de dos maneras:

- a) aumentando el número de tanques, lo que evidentemente tiene un límite práctico.
- b) introduciendo en el simulador, en lugar de agua de mar y de río, agua del estuario de salinidades tan próximas como se desee. Esto equivaldría a hacer una ampliación de una zona concreta del estuario que tuviera un especial interés por su mayor reactividad o por cualquier otra causa.

En cualquier caso, el grado de aproximación entre la variación escalonada de la salinidad en el simulador ($S = S_i$ entre $x=i+1$ y $x=i-1$) y el gradiente longitudinal continuo ($S=f(x)$) del estuario real, puede medirse, teniendo en cuenta el factor de escala, comparando el contenido de sales en ambos casos.

Así, si el contenido total de sales del estuario [$S_T(E)$] y del simulador [$S_T(S)$] viene dado, respectivamente, por:

$$S_T(E) = \int_0^x A(x) \cdot S(x) \cdot dx \quad y \quad S_T(S) = \sum_{i=1}^n V_i \cdot S_i \quad [3]$$

donde $A(x)$ y $S(x)$ expresan, respectivamente, la variación de la sección y la salinidad a lo largo del eje longitudinal del estuario.

Así, puede definirse una magnitud (Λ), que mediría el grado de aproximación de la simulación de la siguiente manera:

$$\Lambda = \frac{1}{\frac{1}{V_T} \int_0^x A(x) \cdot S(x) \cdot dx - \left[\frac{\sum_{i=1}^n V_i \cdot S_i}{\sum_{i=1}^n V_i} \right]} \quad [4]$$

en la que V_T es el volumen total del estuario y, al igual que antes, V_i es el volumen de cada uno de los tanques del simulador.

La función Λ tendría valores mayores a medida que la simulación fuese más realista, y viceversa. En el caso límite de un simulador hidráulico, Λ tendería a infinito. Conceptualmente, el grado de aproximación de la simulación del proceso de mezcla

estuárica con un dispositivo basado en el procedimiento expuesto podría asimilarse a la aproximación que se consigue en la resolución de una integral determinada utilizando el método de Simpson.

En la actualidad, sólo se dispone de referencias bibliográficas de tres trabajos en los que se haya realizado una simulación del proceso de mezcla estuárica utilizando una aproximación de este tipo: Bale y Morris (1981), Ortega et al. (2001) y García-Luque et al. (2002). En el primero se estudió el comportamiento del Fe y del HPO_4^{2-} reproduciendo, con sólo cinco tanques, el gradiente de salinidad en régimen estacionario de la parte fluvial del estuario del Tamar. En el segundo, se describe un simulador de dimensiones mayores construido, fundamentalmente, con fines docentes, que permitía - entre otras cuestiones- estudiar la dependencia de la solubilidad del oxígeno disuelto con la salinidad y la temperatura. La tercera referencia muestra una parte del trabajo recogido en esta Memoria.

2.1.2. Aspectos prácticos del diseño del simulador

El diseño de un dispositivo que opere según el diagrama de la figura 2.1. supone definir inicialmente cuatro cuestiones:

- a) las dimensiones del equipo, dadas fundamentalmente por el tamaño de los tanques y su número.
- b) los caudales a transferir desde un tanque a otro y la forma de realizarlo.
- c) la clase de estuario que se desea simular.
- d) el tipo de simulación que se desea realizar.

a) Dimensiones del Equipo

Excepto para determinar el tiempo de residencia, el volumen de los tanques no es relevante para el estudio de la reactividad química de las especies que pasan a través del estuario, ya que la reactividad química no varía cuando se cambia de escala. Esto, que está implícito en cualquier análisis químico, hace que el tamaño mínimo de los tanques esté determinado por el volumen de agua necesario para efectuar los análisis previstos.

No obstante, si en la simulación se pretende mantener organismos en los tanques (por ejemplo, para estudiar los efectos sobre los mismos de un contaminante determinado), sería necesario considerar el volumen mínimo de estabulación por individuo a la hora de establecer el volumen de cada tanque.

b) Caudales entre los distintos tanques

Los caudales han de establecerse mediante balances de materia en cada tanque, en función de los valores de la salinidad que se desean mantener en todos ellos y los parámetros de operación que se establezcan, como por ejemplo $dV_i/dt=0$, $dS_i/dt=0$ ó cualquier otra condición que se desee imponer. Sus valores vienen determinados también por la relación entre los flujos de agua de río y de mar que entran en el sistema y por los volúmenes de los distintos tanques que lo componen. En función de los valores de los flujos que se requieren, existe la posibilidad de elegir entre diversos tipos de bombas para conseguirlos: centrífugas, de pulsos, de membrana o peristálticas.

En cualquier caso, aún utilizando las bombas más precisas, resulta muy difícil mantener todos los caudales en los valores fijados *a priori* a fin de que los volúmenes de los tanques permanezcan constantes ($dV_i/dt=0$) o varíen en la forma deseada ($dV_i/dt=f(t)$). Una solución a este problema, cuando se desea que el volumen permanezca constante, es disponer los tanques de forma que el nivel de agua de cada uno quede por debajo que el de los precedentes (que serían los que tienen una salinidad menor). De esta manera, el flujo de cada tanque al inmediatamente inferior (de mayor salinidad) puede realizarse mediante un sistema de rebose practicado a la altura adecuada. Esto, por otra parte, reduce sensiblemente el coste de construcción del simulador al disminuir el número de bombas necesarias.

c) Tipo de estuario que puede simularse

A diferencia de lo que ocurre con la reactividad química, los mecanismos de transporte que afectan a la dispersión de cualquier sustancia química a través de un estuario – difusión y advección-, no soportan un cambio de escala. Sólo podría conseguirse con la difusión (que es el proceso menos eficaz) si la fase acuosa del estuario estuviera contenida en un medio poroso que permitiera que los coeficientes de difusión tomaran valores proporcionales a las dimensiones de los tanques que componen el simulador. Por

esta razón no resulta sencilla la simulación de estuarios parcial o fuertemente estratificados.

Teniendo en cuenta estas dificultades de índole práctica, la simulación de los procesos en estuarios ha de limitarse a aquéllos que son (o se aproximan) al tipo A de la clasificación de Beer (vertical y lateralmente homogéneos). La consecución de una distribución de la salinidad homogénea en los distintos tanques del simulador obliga, por tanto, a introducir una agitación en cada uno de ellos suficiente como para conseguir que se aproximen suficientemente al modelo ideal de un reactor químico en mezcla completa. Esta es, por otra parte, una cuestión que interesa comprobar para asegurar que la salinidad en cada tanque –y la del caudal de agua que fluye hacia su anterior y su posterior- mantiene los valores prefijados.

d) Tipo de simulación que puede realizarse

El establecimiento de la extensión de la reactividad química que afecta a una sustancia concreta en un estuario ha de referirse a las propiedades del medio en el lugar concreto en que se mide. Así, la cuantificación de las pérdidas o ganancias de dicha especie en la fase disuelta puede hacerse simplemente a partir de una representación de su concentración frente a un índice conservativo del grado de mezcla de agua de mar y de río (generalmente, la salinidad o la clorinidad).

Si este es el objetivo del estudio planteado, la localización geográfica del lugar en que ocurre el proceso químico es secundario, por lo que la simulación puede abordarse utilizando una reproducción en “estado estacionario” del estuario en cuestión. Este concepto alude a un estuario en un estado ideal tal que, estando afectado por la influencia de la intrusión salina del mar, no está sujeto a la acción cíclica de las mareas. Esto implica que tiene un gradiente longitudinal de salinidad, pero que éste no varía con el tiempo.

Siendo x la dimensión del eje longitudinal del estuario, esta idea puede expresarse como:

$$\left(\frac{\delta s}{\delta x} \right)_t = \text{cte} \quad y \quad \left(\frac{\delta s}{\delta t} \right)_x = 0 \quad [5]$$

Según ésta, el perfil longitudinal de salinidad en el estuario, que es independiente del tiempo, sería aquel que se generaría al considerar que cada sección del estuario mantiene constatemente una salinidad igual al valor medio que registraría a lo largo de un ciclo mareal, o de un número mayor de ellos.

En estas condiciones, la simulación de la mezcla estuárica resulta especialmente sencilla; basta con mantener constantes los volúmenes de los tanques y los caudales de agua que se intercambian entre ellos. Concretamente, la mayoría de los experimentos recogidos en esta Memoria se han realizado en estas condiciones de régimen estacionario.

No obstante, pueden existir circunstancias en las que la reproducción del régimen estacionario no sea conveniente. Este es el caso, por ejemplo, de ensayos en los que se pretende evaluar los efectos de un contaminante concreto sobre un organismo sésil residente en un estuario. Debido a su inmovilidad en el estuario real, este organismo se vería sometido, de manera simultánea, a la acción del contaminante y a la variación periódica de la salinidad del medio. Los efectos sinérgicos de la toxicidad producida por la concentración del contaminante y la modificación que induce en la fisiología de los organismos la variación de la presión osmótica producida por el cambio cíclico de la salinidad no se conocen generalmente. Tales efectos sinérgicos pueden ser importantes, especialmente en organismos como moluscos bivalvos que pueden regular -en función de las características del medio- el tiempo durante el que mantienen las valvas abiertas y sifonan agua del exterior.

En estas circunstancias, y en otras en las que en una localización concreta se requiere conocer la evolución temporal de la composición del medio, es necesario realizar la simulación del proceso de mezcla estuárica incluyendo la acción de las mareas.

La simulación del recorrido de la marea a lo largo del eje longitudinal del estuario es, *a priori*, fácil de simular. Basta con utilizar bombas cuyo caudal pueda variarse con el tiempo de manera que se consiga en cada tanque una evolución de la salinidad igual a la que se registra en cada tramo del estuario real al que representa durante un ciclo de marea.

En este caso sería necesario dimensionar los volúmenes de los tanques a las prestaciones de las bombas disponibles y adecuar los flujos de agua de río y de mar de manera que se reproduzcan los tiempos de residencia reales en el estuario. Estas cuestiones se discuten en el apartado 2.3.2. de este capítulo.

2.2. DISPOSITIVO EXPERIMENTAL

2.2.1. Descripción del equipo

En esencia, el equipo está basado en la realización de una mezcla dinámica de aguas de distintas salinidades poniendo en contacto, en contracorriente, un flujo de agua dulce con otro de agua de mar. Este equipo está basado en una idea original coincidente con la de Bale y Morris (1981), que emplearon el procedimiento de mezcla dinámica para estudiar el comportamiento del Fe y del HPO_4^{2-} en el estuario del río Tamar (Reino Unido) y es una modificación del equipo desarrollado por Ortega et al. (2001).

El equipo consta de ocho tanques (Figura 2.3.), que están contruidos en metacrilato (plexiglás®), poseen forma cilíndrica y tienen una capacidad de 10 L cada uno. Los tanques están dispuestos en una estructura que los soporta de manera que el fondo de cada uno de ellos se encuentra a un nivel inferior que el del precedente. La figura 2.4. muestra una vista general del simulador.

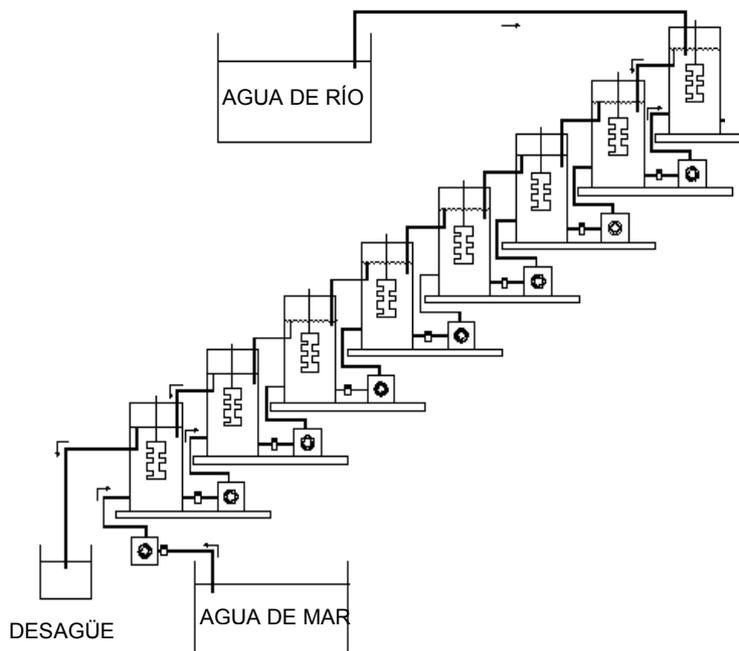


Figura 2.3. Representación esquemática del simulador dinámico de estuarios.



Figura 2.4. Vista general del simulador de estuarios.



Figura 2.5. Vista parcial de uno de los tanques del simulador con todos los dispositivos necesarios para su correcto funcionamiento.

El flujo ascendente de agua más salina desde cada tanque al inmediatamente superior se consigue mediante bombas peristálticas (MasterFlex, modelo 7521-55), cuyos caudales Q_i , pueden regularse en un amplio intervalo (desde 0.5 hasta 120 mL·min⁻¹). El tanque del nivel inferior se alimenta con agua de mar (o de otra salinidad conocida) almacenada en un tanque de gran capacidad aparte de los que integran el simulador, a razón de Q_M mL·min⁻¹. El flujo de agua de río (o de una salinidad también conocida), se introduce en el sistema a través del tanque del nivel superior, mediante otra bomba peristáltica que proporciona un caudal Q_0 . El agua de río (o de salinidad conocida), se almacena a su vez en otro tanque ajeno a los que integran el simulador.

A través de un sistema de rebose hacia el tanque inmediatamente inferior, el volumen de cada uno de ellos se mantiene constante. Este sistema de rebose establece el flujo descendente de agua y su valor viene dado para cada tanque por la suma del caudal que asciende del tanque inmediatamente inferior y el caudal del río. El último tanque (el de nivel inferior) posee, como el resto, un sistema de rebose que mantiene su volumen constante y cuyo efluente (caudal) vierte a un desagüe.

Cada tanque tiene un sistema de aireación que está conectado a una bomba electrosoplante. El porcentaje de saturación de oxígeno en cada tanque puede variarse a voluntad introduciendo en el sistema de aireación construido un gas inerte o una mezcla adecuada de gas inerte y aire. La figura 2.5. muestra una vista de uno de los tanques del simulador.

Los tanques están provistos de una tapa a través de la que se introducen los siguientes elementos:

- a) el rebose del tanque inmediatamente superior.
- b) un difusor para la aireación.
- c) un termostato.
- d) un termopar.

existen, además, dos aberturas más: una para la toma de muestras del agua de cada tanque y otra que ocasionalmente puede utilizarse para muestrear el volumen de aire contenido sobre la capa de agua.

La agitación del agua contenida en cada tanque se realizó de dos maneras diferentes, en función del tipo de experimento a desarrollar:

- a) por medio de una pala agitadora conectada a una fuente de alimentación de corriente continua provista de un potenciómetro. Su diseño y dimensiones (figura 2.6.) se optimizaron para asegurar un régimen turbulento en el interior de cada tanque.
- b) introduciendo en el tanque una bomba sumergible capaz de proporcionar un caudal de $300 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$.

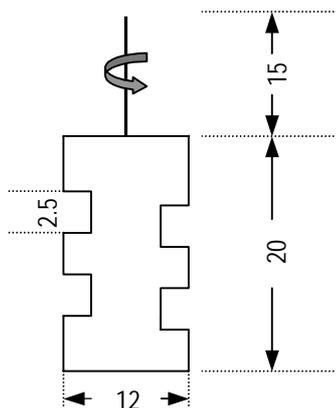


Figura 2.6. Diseño y dimensiones de las palas agitadoras empleadas en el simulador (todas las cotas están expresadas en cm).

El control del funcionamiento del equipo se realiza por medio de un ordenador. Para ello, ha sido necesaria la construcción de una Tarjeta de Adquisición de Datos compatible con las características técnicas de los aparatos regulables que integran el equipo (bombas peristálticas, caudalímetros, termopares y termostatos). Para poder realizar un “control remoto” del simulador es necesario el registro continuo de los distintos caudales que suministran las bombas que integran el equipo. Por tanto, a la salida de cada bomba se encuentran instalados unos caudalímetros (McMillan Co., Flow-Sensor 111) que llevan a cabo dicha misión.

La tarjeta es, en esencia, un convertidor Analógico-Digital que incluye unos lazos de control que permiten regular el funcionamiento del equipo. La tarjeta está controlada por un software que implementa un algoritmo PID del tipo velocidad. Como soporte informático se ha desarrollado un software en lenguaje informático Visual Basic para controlar tanto los distintos caudales que suministran las bombas peristálticas como la temperatura de cada uno de los tanques. En una “librería de enlace dinámico” determinada de Visual Basic, se encuentran el conjunto de funciones que permiten manejar el sistema de control de caudal y temperatura desde aplicaciones Windows.

Se dispone así de funciones para leer el valor de los 24 canales analógicos (medida de variables “caudal” y “temperatura”, a través de caudalímetros y termopares, respectivamente), control analógico de las bombas peristálticas a través de 16 salidas (4-20 mA) y control “on/off” (PWM) de las 16 salidas “triacs” para el control de los termostatos. Se incluyen, además, funciones para leer y grabar, en la memoria no volátil que contiene la placa de entradas analógicas, los valores de la calibración en los 24 canales.

La tarjeta actúa combinada con el PC proporcionando un mecanismo de autorregulación del equipo. Permite recibir la lectura de los caudalímetros de cada bomba y, según sea su valor instantáneo, se aumenta o disminuye de manera automática la velocidad de giro de las bombas peristálticas para adecuar su caudal al valor nominal. Del mismo modo actúa el control de temperatura; los termopares mandan información de la temperatura de cada tanque y, en función de su valor, la tarjeta de adquisición de datos hace conectarse o desconectarse los termostatos. Puede decirse que se establece un control por retroalimentación.

Anteriormente, se ha reseñado que la función de regulación del programa de control de todo el sistema implementaba un algoritmo PID del tipo velocidad. El lazo de control que hace funcionar correctamente el equipo posee tres parámetros denominados Ajustes de Sintonizado del Controlador:

1. K = Ganancia o banda proporcional.
2. T_i = Tiempo Integral o tiempo de reajuste.
3. T_d = Tiempo Derivativo.

Variando convenientemente los valores de estos tres parámetros de forma simultánea, se puede optimizar el lazo de control de caudal y temperatura. Por ello, antes de comenzar los experimentos que conforman esta Memoria, se tuvieron que optimizar los lazos de control de caudal y temperatura a fin de obtener unos resultados satisfactorios. Para ello, se realizó una batería de pruebas en las que se fueron variando los valores de los distintos ajustes de sintonizado.

Todo Lazo de Control se define por dos parámetros: tiempo y cantidad. Por tanto, el sintonizado de lazos está relacionado con adecuar los parámetros de tiempo y cantidad del controlador a los parámetros de tiempo y cantidad del proceso. El problema es

conseguir la mejor adaptación dentro de las restricciones que necesariamente implica presentar adecuadamente el proceso.

En todo este tema del sintonizado de ajustes de control, conviene incidir en dos características:

- a) A medida que aumenta la Ganancia (K), el sistema deviene más oscilante. La desviación permanece (diferencia entre el valor deseado y el actual), aunque se hace menor, si bien nunca llega a cero.
- b) Para resolver este problema de desviación permanente, se introduce la acción integral o de reajuste. Al disminuir el tiempo de reajuste (T_i), la respuesta deviene de nuevo más oscilatoria y el período de oscilación se hace mayor (y la desviación permanente se elimina).

2.2.2. Pruebas de funcionamiento

a) Control de temperatura y caudales

En la figura 2.7., se pueden ver algunos ejemplos de los distintos valores de las desviaciones estándar de las pruebas que se realizaron para hallar los mejores valores de los distintos ajustes de sintonizado (K , T_i y T_d). En las pruebas se mantenían dos parámetros constantes y se variaba el tercero.

La primera conclusión obtenida fue que el Tiempo Derivativo (T_d) debía tener siempre el valor que presenta por defecto (1000 ms), lo cual concuerda con la Teoría de Sintonizado de Controladores y Comportamiento de Lazos de Control. En consecuencia, K y T_i eran los parámetros a optimizar. Tras probar todas las combinaciones posibles, se concluye que los valores óptimos de estos dos parámetros son: $K= 1.5$ y $T_i= 4000$ ms, para la regulación óptima del caudal y $K= 4$ y $T_i= 4000$ ms, para la regulación óptima de la temperatura. Con estos valores se consiguen las menores desviaciones estándar. Obsérvese que estas pruebas tuvieron una duración de aproximadamente dos horas. Si se aumenta la duración de los ensayos, los valores de las desviaciones estándar son aún menores.

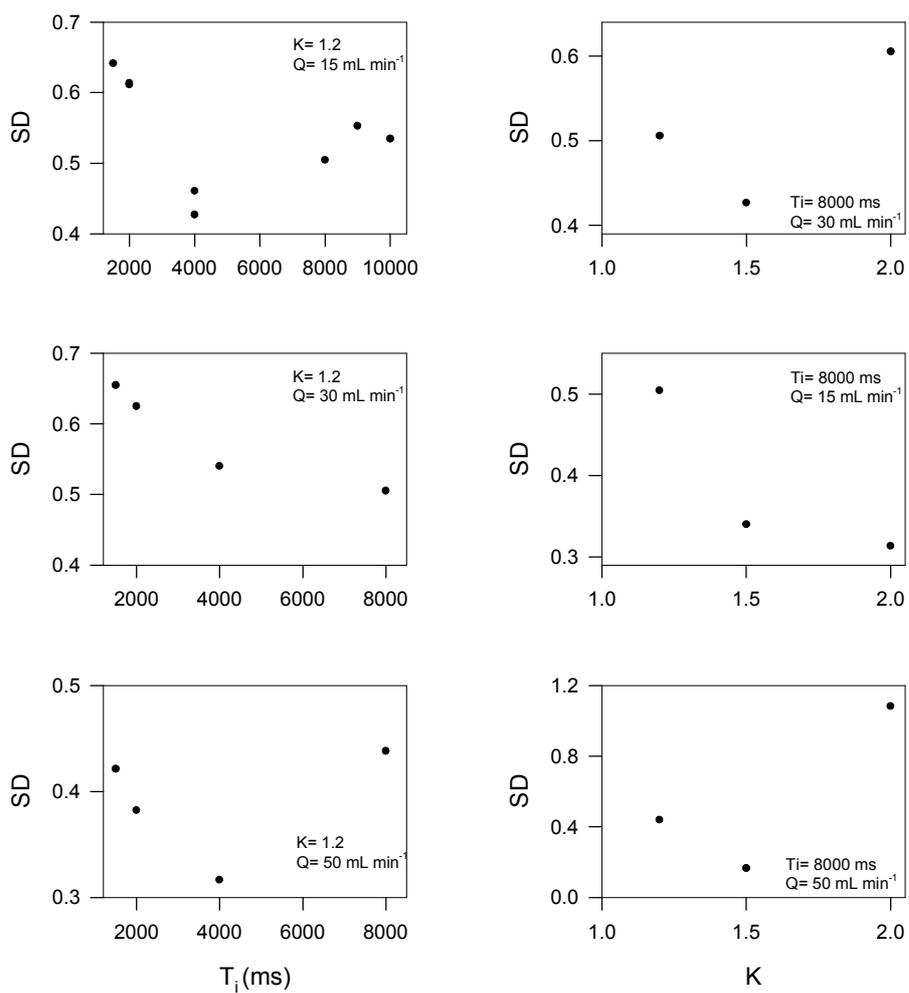


Figura 2.7. Variación de la desviación estándar con los distintos parámetros de ajuste ensayados. (SD = Desviación Estándar; K = Ganancia; T_i = Tiempo Integral)

En la figura 2.8., que se muestra a continuación, se puede ver qué valores medios y qué desviaciones estándar se alcanzan para toda una gama de caudales, utilizando tanto los parámetros óptimos como otros distintos de éstos.

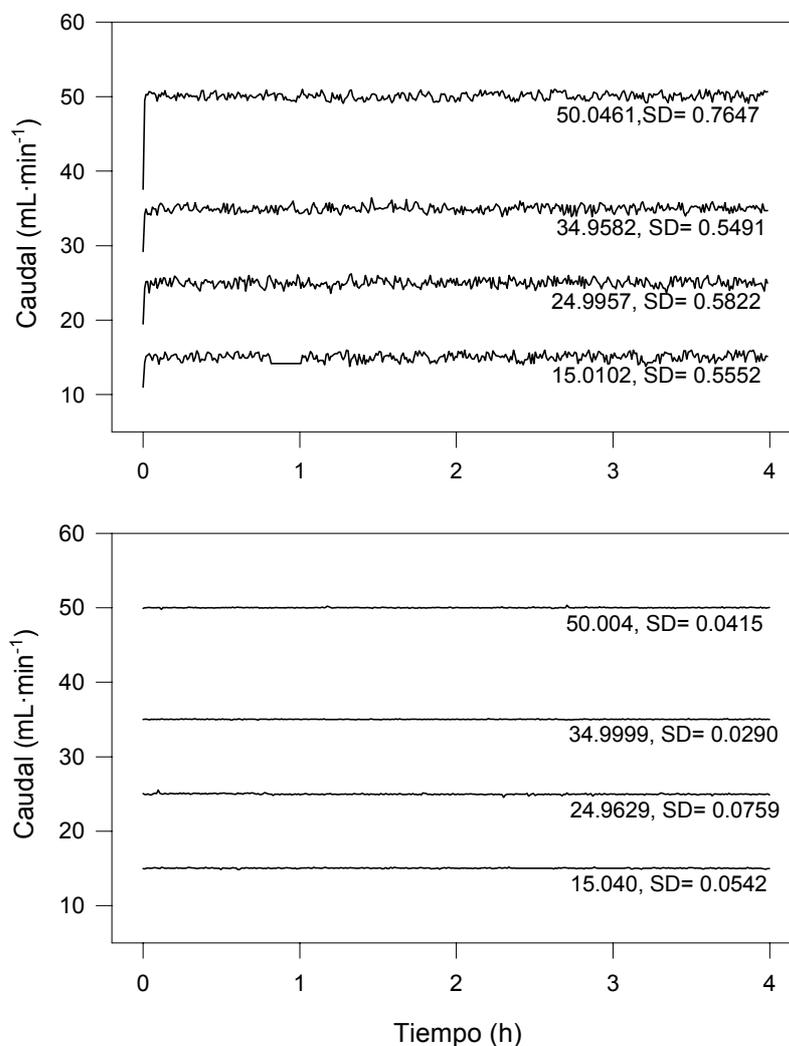


Figura 2.8. Dos ejemplos de la distinta estabilidad de los caudales suministrados por las bombas conseguida con parámetros de ajuste distintos. (En la gráfica inferior se han usado los valores considerados como óptimos, ya que son los que minimizan las desviaciones estándar registradas. $K = 1.5$ y $T_i = 4000$ ms)

Se aprecia que, con los parámetros optimizados, el "ruido" de las curvas es muy inferior. Los valores medios de caudal están más ajustados y las desviaciones estándar son menores.

Con esta confirmación en pruebas de larga duración, se pasó a usar estos valores optimizados de K y T_i en las distintas simulaciones que conforman esta Memoria. Los resultados obtenidos refrendaron *a posteriori* la decisión adoptada. (Figura 2.9.)

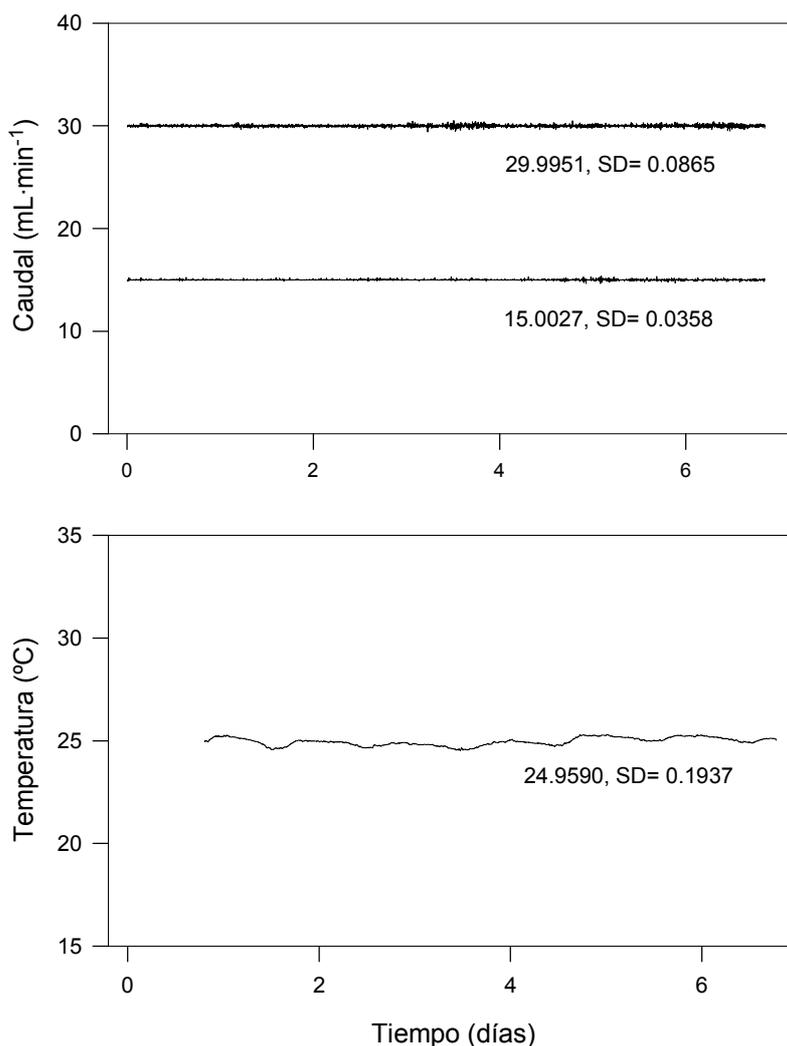


Figura 2.9. Estabilidad de los caudales suministrados por las bombas peristálticas y de la temperatura en las pruebas previas a los experimentos descritos en esta Memoria. Dichas pruebas tuvieron una duración aproximada de 7 días.

Estos valores óptimos de K y T_i , tanto para temperatura como para caudal, se han empleado en todos los experimentos que integran la memoria, bien en estado estacionario, bien en régimen mareal. El siguiente paso fue estudiar el **grado de reproducibilidad que permite el equipo** en ambos supuestos.

a) En el caso de *régimen estacionario*, se han enfrentado, en una gráfica, los datos de la salinidad teórica esperada de cada uno de los tanques del equipo frente a los datos de la salinidad experimental obtenidos tras muestrear dichos tanques en un experimento concreto.

El resultado se presenta en la figura 2.10., donde se aprecia el índice de correlación excelente ($r^2=0.992$) entre ambos grupos de valores, lo que confirma un comportamiento correcto del equipo durante el desarrollo completo del experimento.

En todos los experimentos, los datos de salinidad experimental se obtuvieron mediante medida de la conductividad en salinómetro. La salinidad se midió con un salinómetro de inducción BECKMAN, modelo RS-10, con control automático de temperatura. Una vez calibrado con agua de mar estándar (IAPSO, bath P93), se obtienen la conductividad relativa y la temperatura de las muestras y, por medio de los cálculos pertinentes, se consigue directamente la salinidad. La precisión del equipo para la medida de la salinidad es de $\pm 0,001$.

Los datos de salinidad teórica esperada en cada tanque (una vez alcanzado el estado estacionario) se hallaron resolviendo el sistema de ecuaciones planteado en el apartado 2.3.1. de este capítulo, en el que la expresión de la solución de forma generalizada es:

$$S_i = \frac{\left(\prod_1^{i-1} Q_i' \right) \cdot S_1 - \left[\prod_2^{i-1} Q_i + \sum_{k=1}^{i-3} \left(\prod_2^{i-k-1} Q_i \cdot \prod_{i-k}^{i-1} Q_i' \right) + \prod_2^{i-1} Q_i' \right] \cdot Q_0' \cdot S_0}{\prod_2^i Q_i} \quad [1]$$

Esta expresión obtenida permite determinar la salinidad teórica de cada tanque del simulador a partir de los caudales experimentales empleados en el ensayo.

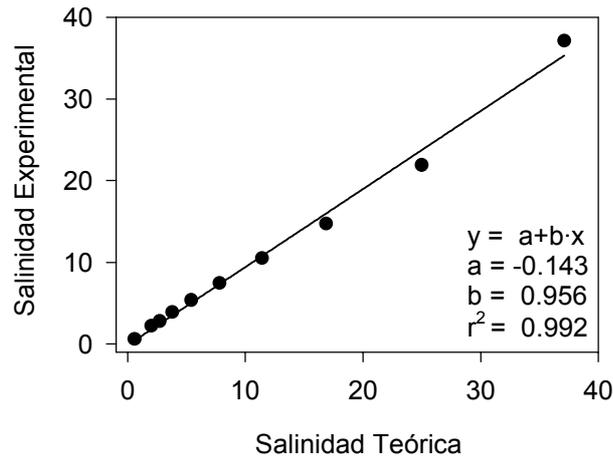


Figura 2.10. Representación de la salinidad calculada de forma teórica frente a la salinidad medida experimentalmente en los distintos tanques en un ensayo en estado estacionario.

b) En el caso de *régimen mareal* también se han representado valores de salinidad media experimental frente a valores de salinidad media teórica (figura 2.11.). Lógicamente, hay que emplear valores medios en el caso de régimen mareal ya que la salinidad varía con el tiempo.

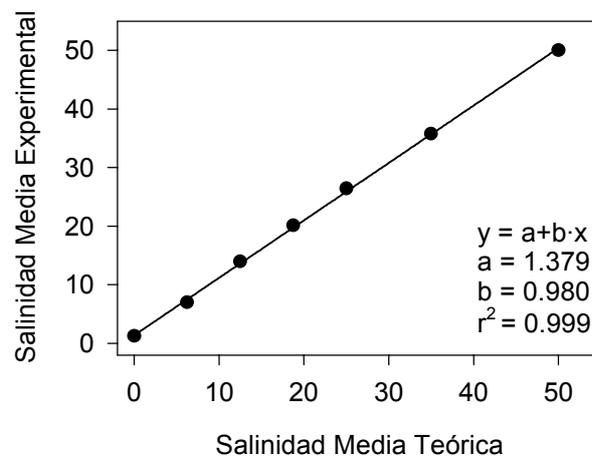


Figura 2.11. Representación de la salinidad calculada de forma teórica frente a la salinidad media en cada tanque medida experimentalmente en un experimento en régimen mareal.

Esta vez, la salinidad media teórica se calcula sustituyendo los valores propios de cada tanque en la expresión genérica de la salinidad teórica (que, en este caso, es función del tiempo de acuerdo con una ecuación de onda de tipo semidiurno):

$$S_x = S_x(t) = M_x + A_x \cdot \text{sen}(\omega \cdot t + \phi_x) \quad [2]$$

En este supuesto, las salinidades experimentales no pueden medirse en un salinómetro, pues se necesita un volumen de muestra demasiado grande, lo que desvirtuaría

posteriores mediciones debido a que en este caso no es suficiente medir la salinidad al final del experimento (como sucede en el régimen estacionario). Ahora es preciso medir la salinidad en continuo, al menos en un ciclo de marea completo, para ver cómo evoluciona en cada tanque durante dicho ciclo.

Por tanto, fue necesaria la instalación de equipos adicionales en el simulador para verificar que los gradientes de salinidad que se obtenían eran coherentes con los esperados y hacer un seguimiento en continuo de los mismos. Para ello, se instalaron tres conductímetros (Crison-522) en los distintos tanques del simulador, y sus mediciones se recogieron mediante un segundo sistema de adquisición de datos conectado a un ordenador personal distinto del que controlaba el equipo de simulación. Gracias al registro de la conductividad en tiempo real (cada 90 segundos), se pudo obtener, mediante una regresión lineal, la variación en continuo de la salinidad con el tiempo en cada uno de los tanques del simulador. En la Tabla 2.1. se presentan los parámetros de calibración de cada conductímetro (Conductividad = $y_0 + a \cdot \text{Salinidad}$).

Tabla 2.1. Valores de los parámetros de calibración de los conductímetros empleados para el registro en continuo en los experimentos de régimen mareal.

	Conductímetro 1	Conductímetro 2	Conductímetro 3
y_0	6.560e-2	3.113e-2	3.812e-2
a	2.969e-2	2.957e-2	2.636e-2
r^2	0.9951	0.9959	0.9955

En la figura 2.11. se presentan valores de salinidad media experimental frente a valores de salinidad media teórica y se aprecia una correlación excelente ($r^2=0.994$) entre ambos grupos de valores, lo que confirma un comportamiento correcto del equipo durante el desarrollo completo del experimento. Una vez obtenidos los datos experimentales de salinidades tras los ensayos de simulación, se puede verificar la validez de la expresión genérica de Q_i (ver ecuación [15], apartado 2.3.2.) hallada tras la resolución del sistema de ecuaciones planteado en ese mismo apartado.

Se presentan dos grupos de gráficas donde se puede ver, por un lado, la evolución de los caudales de las distintas bombas frente al tiempo y, por otro, cómo fue variando la salinidad en cada tanque a lo largo del tiempo. (Figura 2.12.a. y 2.12.b., respectivamente).

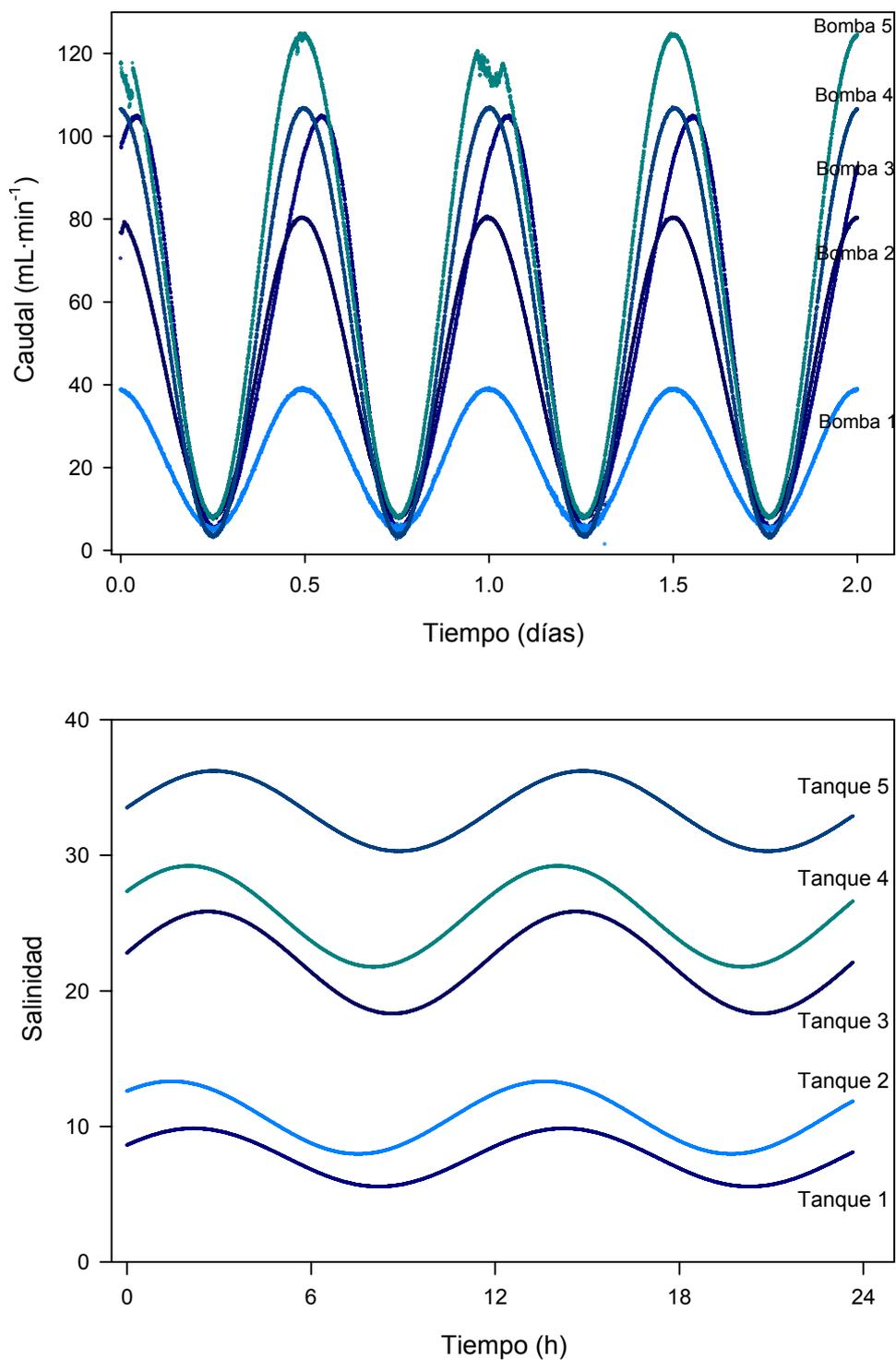


Figura 2.12. a) Variación temporal de los caudales suministrados por las bombas peristálticas que interconectan los tanques del simulador durante los experimentos en régimen marea. b) Variación temporal de la salinidad en cada uno de los tanques del simulador durante los experimentos en régimen marea.

b) Grado de aproximación a un estuario verticalmente homogéneo.

Antes de utilizar el equipo, fue necesario asegurar que cada uno de los tanques que constituyen el simulador estuviera perfectamente agitado.

Se decidió efectuar una medida definitiva de la eficacia del sistema de agitación, lo que aseguraría una mezcla totalmente homogénea, y del acierto en la elección de la forma de los tanques, conducente a verificar dicho comportamiento. La eficacia del sistema de agitación tiene una importancia capital para asegurar la representatividad que poseen las muestras que se toman en cada tanque.

Lo que se pretendía era verificar que no existieran en los tanques gradientes de salinidad verticales. Una forma de hacerlo es por medio de técnicas estímulo-respuesta, considerando que cada tanque puede asimilarse conceptualmente a un reactor químico, que debe trabajar en régimen de mezcla completa.

Como trazador se ha empleado un colorante (eosina) que se inyectó simulando una función en escalón. La elección de la eosina como trazador se debe a que no es absorbida por ninguno de los materiales que componen el equipo, es fácilmente cuantificable de manera espectrofotométrica y sigue la ley de Lambert-Beer en un intervalo muy amplio de concentraciones. Posee la ventaja adicional de que en la oscuridad su degradación es muy lenta. El dispositivo experimental empleado en dichos ensayos estímulo-respuesta se muestra en la figura 2.13.

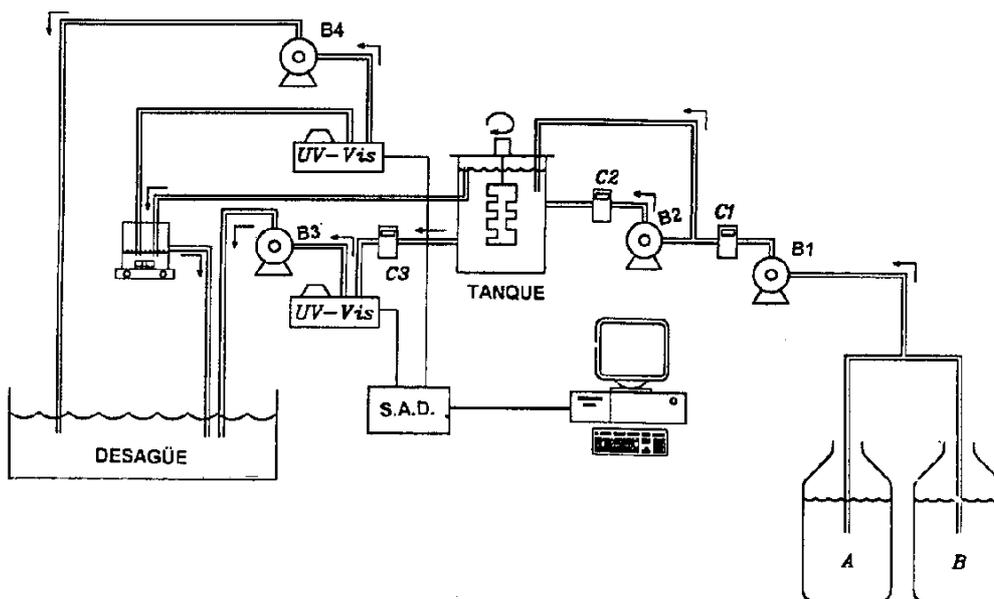


Figura 2.13. Representación esquemática del dispositivo experimental empleado en los ensayos estímulo-respuesta.

En esencia, consta de un tanque con una pala agitadora conectada a una fuente de alimentación variable, debiendo encontrarse la velocidad de giro óptima de dicha pala a fin de que el tanque se comporte como un reactor de mezcla completa. Se pretende, por medio de varios ensayos, optimizar en una solución de compromiso, velocidad de giro de la pala frente al grado de homogenización de la mezcla de tal manera que el tanque se comporte como un reactor de mezcla completa con la potencia mínima necesaria para ello.

Por medio de tres bombas peristálticas se pretenden simular las dos entradas y las dos salidas de agua que posee cada uno de los tanques que integran el equipo de simulación, funcionando de manera idéntica a como lo haría en una simulación concreta. En consecuencia, es necesario analizar ambas señales de salida por separado utilizando para ello sendos espectrofotómetros (idénticos) que miden las salidas en continuo por medio de celdas de flujo. Esto permitió ir almacenando los datos de absorbancia a 519 nm por medio de un sistema de adquisición de datos conectado a un ordenador personal.

Existen dos depósitos independientes, uno de ellos con agua y el otro con una mezcla de agua y eosina (30 mL de eosina en 50 L de agua) a fin de que no posea una concentración demasiado elevada. Al principio del ensayo, se inyecta agua del primer depósito al tanque por medio de las bombas peristálticas y, cuando pasan aproximadamente 30 minutos, se procede a la inyección de la disolución de eosina.

La larga duración de los ensayos (24 horas aproximadamente) asegura cuatro o cinco veces el tiempo de residencia de la eosina, condición indispensable para el posterior análisis de los datos registrados.

En la Figura 2.14. se presenta la variación de la absorbancia de eosina con el tiempo a lo largo del ensayo estímulo-respuesta. Para el análisis de la curva que representa la evolución de la concentración de eosina frente al tiempo se ha empleado el modelo de Levenspiel (1972). Tras el tratamiento estadístico de los datos obtenidos en el ensayo, puede concluirse que el sistema en su conjunto se comporta prácticamente en un 96.2% como un reactor de mezcla completa ideal y en un 3.8% como un reactor en flujo pistón. Para el ensayo en el que la pala agitadora gira a 55 r.p.m., el 96.2% de su volumen está absolutamente homogeneizado. Por tanto, las alícuotas que se retiran para el análisis de la composición en su interior, son representativas de todo el volumen incubado en ese porcentaje. Así, para una intensidad de 5 voltios suministrada a las bombas que accionan las palas agitadoras, el sistema se comporta de forma óptima.

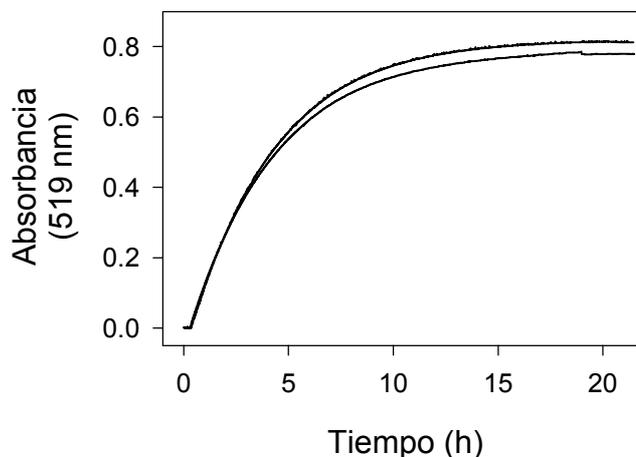


Figura 2.14. Variación de la absorbancia de eosina con el tiempo a lo largo del ensayo estímulo-respuesta conducente a optimizar la velocidad de giro de las palas agitadoras.

c) Control del grado de mezcla en los distintos tanques del estuario mediante el uso de distintos índices de mezcla

La elección de un índice de mezcla, con el objeto de evaluar el comportamiento de los constituyentes disueltos, debe cumplir el doble objetivo de que dicho índice sea fácilmente medible y que presente un comportamiento conservativo. El índice de mezcla más utilizado en Oceanografía es la salinidad. No obstante, la salinidad puede presentar problemas en la parte fluvial del estuario, ya que en esa zona es posible que deje de cumplirse la constancia de las proporciones relativas de los iones mayoritarios del agua de mar, constancia que está implícita en el concepto de salinidad (Millero y Sohn, 1992). Dicho problema puede solventarse utilizando como índice de mezcla la concentración de alguno de los elementos mayoritarios (con frecuencia, la clorinidad).

Aunque los componentes mayoritarios del agua de mar son relativamente constantes, en los sistemas estuáricos existen algunos factores tales como los procesos provocados por efecto de la mezcla, que pueden provocar que presenten un comportamiento no conservativo, variándose las proporciones relativas de dichos componentes mayoritarios.

La concentración de sales en los ríos está controlada por la naturaleza de las rocas que forman las cuencas hidrográficas en las que el agua va adquiriendo su contenido característico de sales mediante un proceso de lixiviación. Esto hace que la composición de los distintos ríos sea también distinta.

Si se observa la composición media de los ríos, a escala mundial, puede apreciarse que los cationes más abundantes son Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ , mientras que los aniones más abundantes son HCO_3^- , SO_4^{2-} y Cl^- . En comparación con la composición del agua de mar, se observa la aparición de silicatos como uno de los componentes más abundantes.

De forma general, el contenido total de sales disueltas es relativamente bajo, entre 70 y 200 ppm (0.07-0.2 de salinidad). Las relaciones entre las concentraciones de SO_4^{2-} , HCO_3^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ , y la concentración de Cl^- son usualmente mayores que en el agua de mar. Los iones más abundantes en el agua de río son HCO_3^- y Ca^{2+} , que provienen de la lixiviación de minerales calizos.

Puesto que las proporciones de los compuestos más abundantes en el agua de mar y en el agua de río son diferentes, se producen ligeras variaciones de las proporciones relativas entre los elementos mayoritarios a lo largo de un estuario. Un sistema estuárico típico es un ejemplo adecuado para discutir algunas de las limitaciones de la escala de salinidad práctica.

Para disminuir estas limitaciones, se han propuesto algunas expresiones empíricas para aumentar la precisión de las determinaciones de salinidad a partir de conductividades a salinidades bajas y que consiste en añadir una serie de términos a la expresión propuesta por la UNESCO en 1978. Por otra parte, también se ha sugerido la utilización de soluciones de calibración diferentes para el caso de aguas estuáricas.

No obstante, podrían emplearse otros índices distintos a los anteriores (salinidad y clorinidad) aunque su determinación sea más laboriosa, constituyendo además este ejercicio una forma de constatar un doble objetivo: de un lado, verificar el comportamiento conservativo de ciertos elementos que son mayoritarios en el agua de mar (como el Ca^{2+} y el SO_4^{2-}) y cuyo comportamiento conservativo ha sido ampliamente descrito (Hosawaka et al., 1970; Millero y Sohn, 1992; Gordeev et al., 1993, etc...); de otro, controlar que el grado de mezcla en los distintos tanques del simulador responda en la realidad a lo esperado. Así, en esta Memoria, aunque el índice de mezcla empleado en todos los experimentos haya sido la Salinidad, también se han determinado las concentraciones de Cl^- , Ca^{2+} y SO_4^{2-} comprobando de esta forma si en los gradientes de salinidad simulados se verifica la constancia de las proporciones relativas de los iones mayoritarios del agua de mar (que es donde más problemas presenta).

En las figuras 2.15., 2.16. y 2.17. se muestran las variaciones de la concentración de cloruro, calcio y sulfato (respectivamente) con el incremento de salinidad en los distintos

experimentos realizados. La determinación de la concentración de estas especies se requería, además, para el cálculo de los índices de saturación de determinados compuestos insolubles en el agua en algunos de los experimentos descritos en esta Memoria. No obstante, su determinación permite también verificar su posible utilización como índices conservativos de mezcla.

Como se observa en la figura 2.15., en todos los casos, la concentración de cloruro presenta una variación lineal con la salinidad (su expresión se ajusta a la ecuación de una recta).

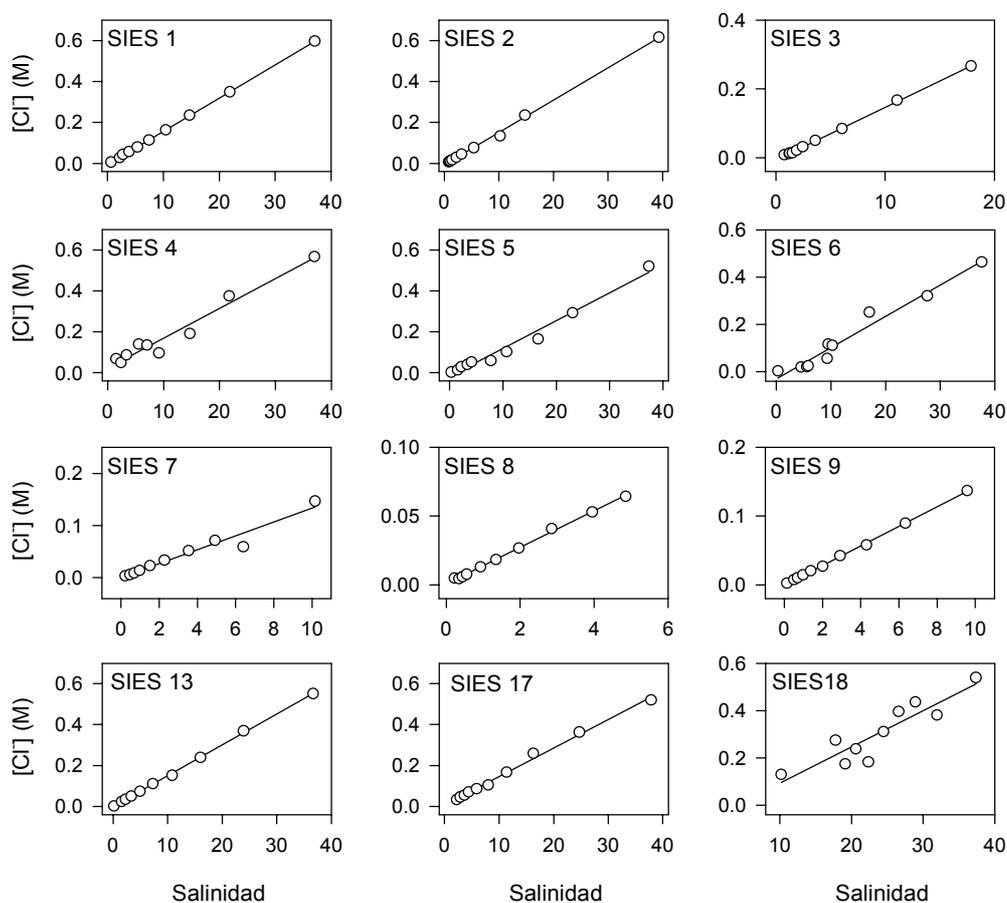


Figura 2.15. Variación de la concentración de Cl^- con la salinidad desde SIES 1 hasta SIES 18 (se reseñan únicamente los ensayos en los que se generó un gradiente de salinidad)

Millero y Sohn (1992) proponen, para sistemas estuáricos, distintas expresiones que relacionan Salinidad y Clorinidad considerando un agua de río con una composición media de un agua mundial típica. Dicha expresión, en el caso de que las determinaciones de la salinidad se realicen a partir de medidas de conductividad, es:

$$S_{\text{COND}} = 0.044 + 1.803898 \cdot \text{Cl}(\text{‰})$$

En todos los casos, las pendientes de las regresiones lineales obtenidas en los experimentos de laboratorio son superiores a la de la expresión propuesta por Millero y Sohn (1992). Ello se debe a que estos autores emplearon en sus cálculos una composición de agua de río media mundial, que difiere de las distintas composiciones de agua de río que se han empleado para realizar las mezclas en los experimentos en laboratorio. No obstante, todas las pendientes obtenidas experimentalmente oscilan en un estrecho intervalo de valores.

Por otro lado, los coeficientes de correlación obtenidos entre ambos parámetros (salinidad y clorinidad) son lo suficientemente buenos como para permitir el uso de la salinidad como índice conservativo de mezcla.

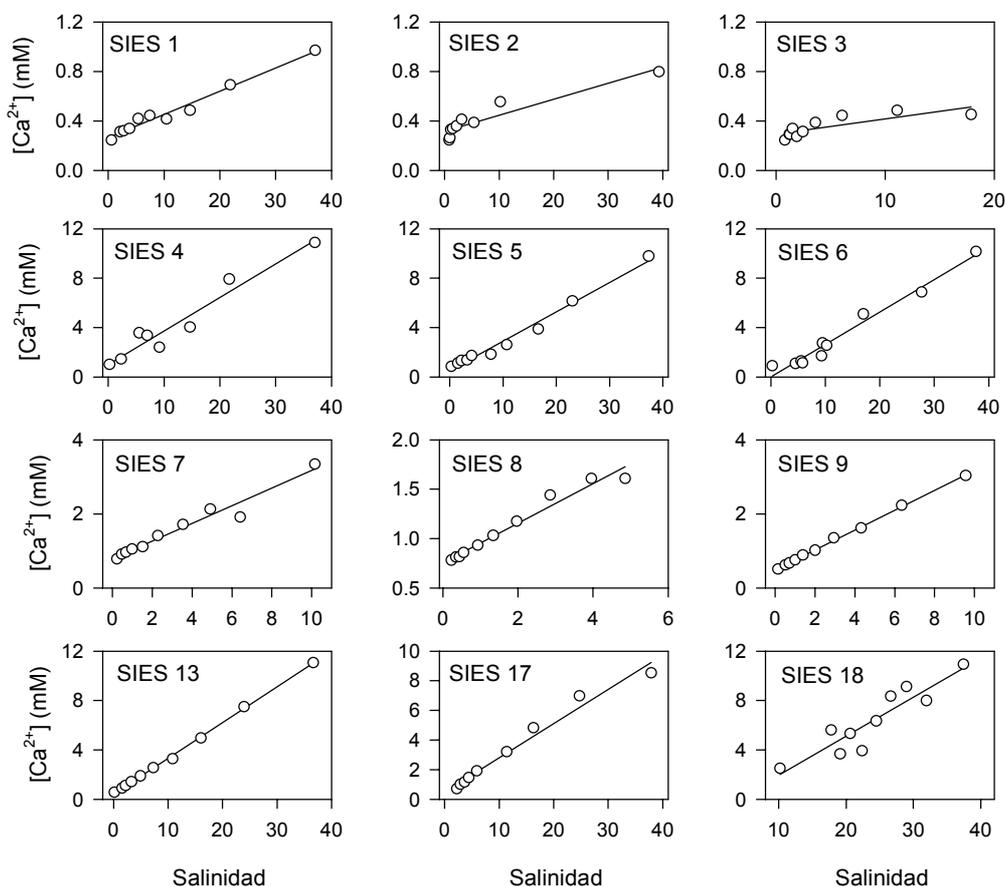


Figura 2.16. Variación de la concentración de Ca^{2+} con la salinidad desde SIES 1 hasta SIES 18 (se reseñan únicamente los ensayos en los que se generó un gradiente de salinidad)

Como se observa en la figura 2.16., en todos los casos, la concentración de calcio presenta una variación lineal con la salinidad. Ello sugiere que el calcio posee un

comportamiento conservativo, como sucede normalmente en los estuarios reales (e.g. Gordeev et al., 1993).

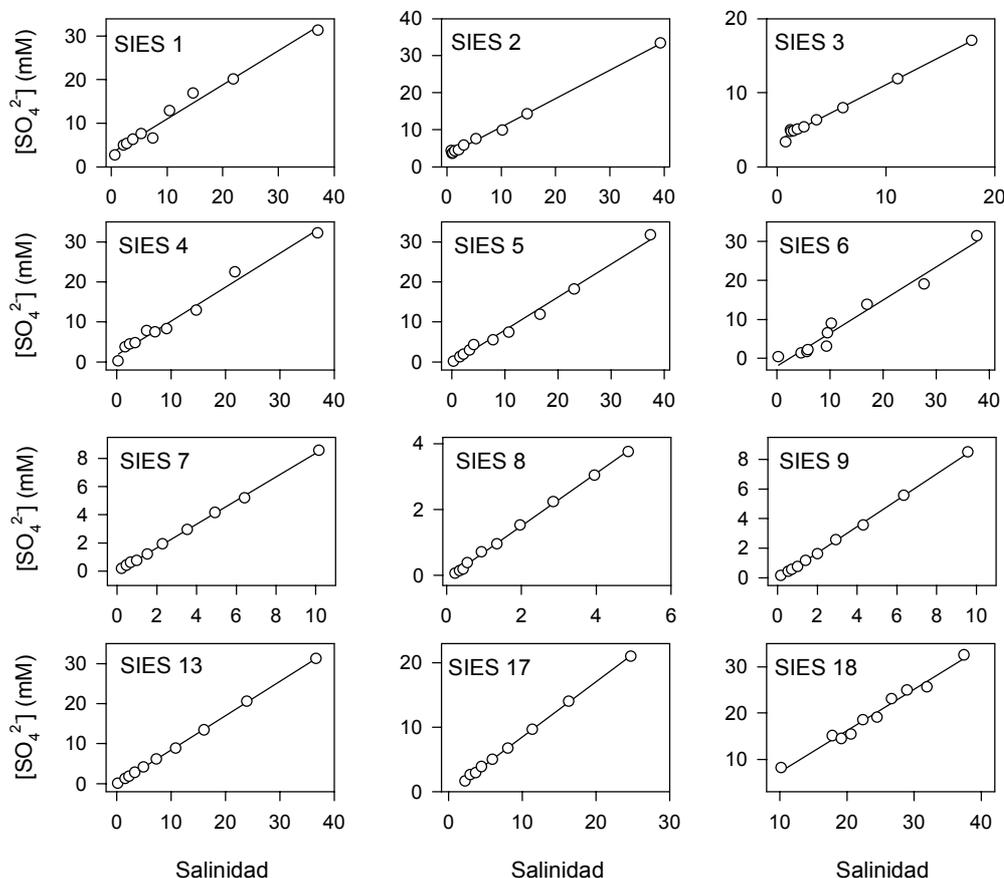


Figura 2.17. Variación de la concentración de SO_4^{2-} con la salinidad desde SIES 1 hasta SIES 18 (se reseñan únicamente los ensayos en los que se generó un gradiente de salinidad).

En la figura 2.17., en todos los casos, la concentración de sulfato presenta una variación lineal con la salinidad. No existen muchas diferencias entre el comportamiento obtenido en los ensayos de simulación y las variaciones que suelen encontrarse en los estuarios reales. Puede observarse un comportamiento típicamente conservativo, donde la concentración de sulfato varía según la línea de dilución teórica. A modo de ejemplo, Hosawaka et al. (1970) describen este comportamiento en el estuario del Chikugogawa.

En cualquier caso, y como se reseñó anteriormente, el índice de mezcla empleado en todos los experimentos descritos en esta Memoria ha sido la Salinidad.

2.3. ALTERNATIVAS PARA LA SIMULACIÓN DEL PROCESO DE MEZCLA ESTUÁRICA

2.3.1. Simulación en régimen estacionario

El régimen estacionario alude a un estuario en un estado ideal tal que, estando afectado por la influencia de la intrusión salina del mar, no está sujeto a la acción cíclica de las mareas. Esto implica que tiene un gradiente longitudinal de salinidad, pero que éste no varía con el tiempo. La expresión matemática del estado estacionario, con la condición añadida de que el volumen en todos los tanques ha de permanecer constante, podría expresarse como sigue:

$$dV_i = 0 \quad [1]$$

$$dS_i = 0 \quad [2]$$

En la figura 2.18. se presenta la notación de los flujos de entrada y salida en un tanque cualquiera de los que integran el simulador. Dicha notación es la que se va a emplear en los desarrollos matemáticos que se presentan a continuación.

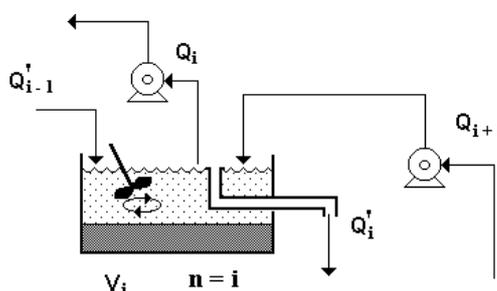


Figura 2.18. Notación de los flujos empleada para los balances de materia. Existen, en cada tanque, dos entradas (Q'_{i-1} , por rebose desde el tanque superior y Q_{i+1} , por bomba desde el tanque inferior) y dos salidas (Q'_i , del rebose al tanque inferior y Q_i , por bomba al tanque superior).

En función de la relación entre Q_0 y el volumen de los tanques, se pueden obtener tiempos de residencia similares a los de los estuarios reales y, eligiendo convenientemente las relaciones entre los caudales Q_0 , Q_M y Q_i , se puede generar cualquier gradiente longitudinal de salinidad que presenten dichos estuarios. Para ello, los caudales Q_i de las bombas pueden obtenerse a partir de las salinidades que se desea

que existan en cada tanque por medio del sistema de ecuaciones que sigue, en el que “i” se refiere a cada uno de los “n” tanques de que consta el simulador. ($1 \leq i \leq 8$)

$$Q'_{i-1} + Q_{i+1} = Q_i + Q'_i \quad [3]$$

$$(Q'_{i-1}) (S_{i-1}) + (Q_{i+1}) (S_{i+1}) = (Q_i + Q'_i) (S_i) \quad [4]$$

donde [3] constituye un balance general de materia para cada tanque y [4] constituye los balances particulares referidos a las sales. Se considera que el volumen y la salinidad de cada tanque no varían con el tiempo. También se asume que la densidad del agua es uno en todo el estuario.

Resolviendo el sistema de ecuaciones integrado por las expresiones [3] y [4], para los ocho valores de “i”, se obtiene la expresión genérica de los distintos caudales necesarios en cada tanque para lograr el gradiente longitudinal de salinidad deseado:

$$Q_i = Q_R \cdot \left[\frac{(S_{i-1} - S_R)}{(S_i - S_{i-1})} \right] \quad [5]$$

Como se ha descrito en el apartado 2.2.2.a), el sistema integrado por las ecuaciones [3] y [4] puede resolverse de otra manera a fin de obtener una expresión genérica de la salinidad esperable en cada tanque a partir de los caudales empleados:

$$S_i = \frac{\left(\prod_1^{i-1} Q'_i \right) \cdot S_1 - \left[\prod_2^{i-1} Q_i + \sum_{k=1}^{i-3} \left(\prod_2^{i-k-1} Q_i \cdot \prod_{i-k}^{i-1} Q'_i \right) + \prod_2^{i-1} Q'_i \right] \cdot Q'_0 \cdot S_0}{\prod_2^i Q_i} \quad [6]$$

2.3.2. Simulación de la acción de las mareas

Trabajar bajo régimen mareal implica que la salinidad de cada tramo del estuario, representado por el tanque “i”, ha de variar con el tiempo. Es decir, $S_i = S_i(t)$. La función $S_i(t)$ ha de ser una función cíclica, asegurándose así que el estuario no se salinice o se diluya de manera progresiva. No obstante, su expresión ha de depender del régimen de mareas que afecte al estuario y de sus condiciones fisiográficas.

Utilizando el mismo diseño experimental que para la simulación en estado estacionario, adoptando la misma notación para los distintos caudales y con la condición de que el volumen en todos los tanques ha de permanecer constante, se obtiene que

$$dV_i = 0 \quad [7]$$

$$V_i \cdot dS_i = \sum_{j=i-1}^{j=i+1} (-1)^{j+p} \cdot Q_j \cdot S_i \cdot dt \quad [8]$$

Con $1 \leq i \leq n$, $p=0$ si "i" es impar y $p=1$ si "i" es par, y siendo $Q'_0=Q_0=\text{cte}$, $Q_1=0$, $Q_{n+1}=Q_M$

La ecuación [8] expresa el hecho de que la acumulación instantánea de sales en cada tanque depende de la forma en que se desee que la salinidad varíe con el tiempo en cada uno de ellos ($S_i=S_i(t)$), lo que sólo puede conseguirse si $Q_i=Q_i(t)$ y, en consecuencia, $Q'_i=Q'_i(t)$.

De [7] y [8] se obtiene:

$$Q_{i+1} + Q'_{i-1} = Q_i + Q'_i \quad [9]$$

$$Q_{i+1} \cdot S_{i+1} + Q'_{i-1} \cdot S_{i-1} = (Q_i + Q'_i) \cdot S_i + V_i \cdot \left(\frac{dS_i}{dt} \right) \quad [10]$$

donde [9] representa las "n" ecuaciones que expresan el balance general de materia para cada tanque, asumiendo que la densidad es independiente de la salinidad e igual a uno. Teniendo en cuenta también esta aproximación, las "i" ecuaciones representadas por [10] expresan, a su vez, el balance particular de materia referido al contenido instantáneo en sales en cada uno de los tanques. Combinando la ecuaciones [9] y [10] se obtiene:

$$Q_{i+1} \cdot S_{i+1} + Q'_{i-1} \cdot S_{i-1} = (Q_{i+1} + Q'_{i-1}) \cdot S_i + V_i \cdot \left(\frac{dS_i}{dt} \right) \quad [11]$$

La resolución del sistema de ecuaciones deducido requiere conocer la variación temporal de la salinidad en el tramo de estuario que está representado por cada tanque, $S_i(t)$, y con ello la velocidad de variación de la salinidad en aquellos (dS_i/dt), así como los valores concretos de los volúmenes V_i .

Si se desea encontrar la *fórmula general* en este caso de régimen mareal con volumen de los tanques constante, hay que resolver la ecuación [5] teniendo presente dos cosas:

1. Se considera que los volúmenes de todos los tanques son iguales a V.
2. La velocidad de variación de la salinidad en cada tanque viene representada, de forma genérica, por la expresión: dS_i/dt

Resolviendo el sistema se obtiene una expresión genérica de cómo deben ir variando los caudales de las bombas con el tiempo para reproducir el ciclo mareal que se desee:

$$Q_i = \frac{\left[Q_0 \cdot (s_{i-1} - s_0) + V \cdot \left(\sum_{i=1}^{i-1} \frac{\partial S_i}{\partial t} \right) \right]}{(s_i - s_{i-1})} \quad [12]$$

En el caso descrito en esta Memoria se asume que el volumen de los tanques es constante y que la variación con el tiempo de la salinidad en cada punto del estuario puede representarse por una función sinusoidal del tipo:

$$S_x = S_x(t) = M_x + A_x \cdot \text{sen}(\omega \cdot t + \phi_x) \quad [13]$$

donde M_x es el promedio de salinidad en un tramo del estuario situado en la posición "x" de su eje longitudinal, $2A_x$ es la diferencia máxima de salinidad en "x", ω es la frecuencia de la onda de marea y ϕ_x indica el desfase de la pleamar en el lugar "x" con respecto al instante en que se produce en la desembocadura.

Teniendo en cuenta que cada tanque representa a un tramo determinado del estuario para el que M_i , A_i y ϕ_i fueran los valores medios de esas variables, el sistema de ecuaciones anterior puede expresarse como:

$$Q'_{i-1} \cdot [M_{i-1} + A_{i-1} \cdot \text{sen}(\omega \cdot t + \phi_{i-1})] + Q_{i+1} \cdot [M_{i+1} + A_{i+1} \cdot \text{sen}(\omega t + \phi_{i+1})] = (Q'_{i-1} + Q_{i+1}) \cdot [M_i + A_i \cdot \text{sen}(\omega \cdot t + \phi_i)] + V \cdot [A_i \cdot \omega \cdot \cos(\omega \cdot t)] \quad [14]$$

Resolviendo el sistema se obtiene una expresión genérica de cómo deben ir variando los caudales de las bombas con el tiempo para reproducir el ciclo mareal deseado:

$$Q_i = \frac{Q_0 \cdot [M_{i-1} - M_0 + \text{sen}(\omega t) \cdot (A_{i-1} - A_0)] + \left[V \cdot \omega \cdot \cos(\omega \cdot t) \cdot \left(\sum_1^{i-1} A_i \right) \right]}{[M_i - M_{i-1} + \text{sen}(\omega t) \cdot (A_i - A_{i-1})]} \quad [15]$$

La versatilidad del equipo construido ha permitido que se pudiera simular un régimen mareal concreto (en este caso, semidiurno). Para ello, fue necesario modificar el software de control de la tarjeta de adquisición de datos, a fin de que fuese posible hacer que el caudal de las bombas peristálticas variase con el tiempo minuto a minuto durante un ciclo de marea semidiurno (aproximadamente 12 horas, correspondientes a una pleamar y a

una bajamar completas). Una vez transcurridas 12 horas, el ciclo volvía a comenzar. De esa manera, en cada tanque, la salinidad varía con el tiempo de forma cíclica.

No sólo fue necesario modificar el software, sino que también fueron necesarias ciertas modificaciones en el equipo causadas por la principal limitación práctica del mismo, que es la de los caudales suministrados por las bombas. Así, para simular mareas bajo este supuesto, hubo que realizar las siguientes modificaciones:

- Disminuir el volumen V_i de los tanques hasta 5L.
- Reducir el número de tanques útiles para la experimentación (5 tanques).

Futuras mejoras de las prestaciones del equipo

Se ha constatado que el equipo descrito en esta Memoria es capaz de reproducir, de manera dinámica, el proceso de mezcla estuárica, realizando la simulación tanto en régimen estacionario como incluyendo el efecto de las mareas.

No obstante, la simulación del régimen mareal (al igual que el estacionario) se ha realizado, debido a limitaciones eminentemente prácticas, manteniendo el volumen de los tanques constante. Este hecho no influye cuando lo que se pretende es determinar el comportamiento de una sustancia en el estuario (incluso en ambos regímenes). Pero, si lo que se pretende es evaluar los efectos de un contaminante concreto sobre organismos residentes en un estuario, no sólo habría que proceder a la simulación en régimen mareal, sino que además habría de poder variarse el volumen de los tanques con el tiempo durante dicha simulación. De esta forma, se simularían también los períodos de emersión-inmersión a que están expuestas las zonas inundables del estuario, ya que este factor afecta a la fisiología de los organismos, sobre todo en el caso de las especies sésiles y de los moluscos bivalvos.

Así, se conseguirían mejorar las prestaciones del equipo, toda vez que la simulación ganaría en realismo. Para ello, sería necesaria la realización de una serie de mejoras, a dos niveles:

a) *A escala práctica*, y a fin de asegurar que el volumen de los tanques fuese variable con el tiempo, se eliminarían los desagües de dichos tanques. Entonces, el único flujo de agua que se establecería a lo largo del simulador vendría determinado por la acción de las bombas peristálticas. Considerando un ciclo mareal semidiurno, se establecería un

único flujo ascendente desde el tanque 8 hasta el 1 las seis horas correspondientes a la creciente y uno descendente desde el tanque 1 hasta el 8 las seis horas de vaciante, de tal manera que las bombas girarían durante seis horas en un mismo sentido y durante las seis horas siguientes en sentido contrario. (Figuras 2.19.1. y 2.19.2.)

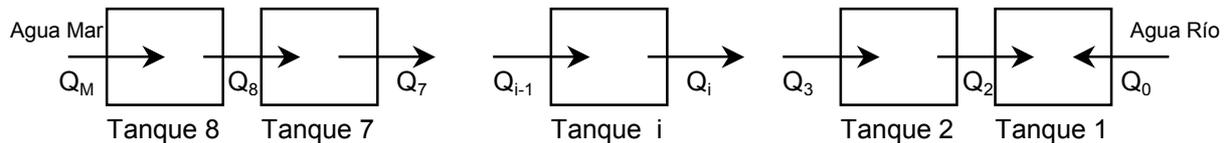


Figura 2.19.1. Esquema del flujo de agua en el simulador durante el período de marea creciente.

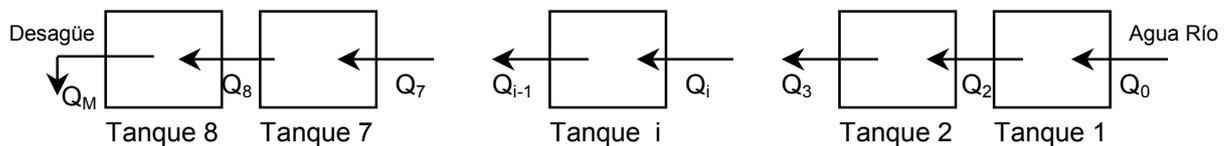


Figura 2.19.2. Esquema del flujo de agua en el simulador durante el período de marea decreciente.

Observando las figuras, y considerando el caso de marea creciente, la dinámica en todos los tanques es idéntica exceptuando la del primero. Esto es, mientras que en todos los tanques existe un caudal de entrada de agua (desde el tanque inferior) y otro de salida (al tanque superior), en el tanque 1 se producen dos entradas: una, directamente desde el tanque inferior (Q_2), y otra desde el depósito de agua de río (Q_0).

También habría que variar las dimensiones de los tanques, de tal forma que pudieran estabularse un número representativo de organismos por tanque sin que sufrieran estrés por confinamiento. Sería necesario, además, aumentar la potencia de las bombas peristálticas a fin de acelerar la capacidad de respuesta de las mismas abarcando, además, un intervalo de caudales mayor en orden a poder simular cuantos supuestos se desee.

b) *A escala teórica*, habría que plantear de nuevo el sistema de ecuaciones que regiría los flujos de las bombas peristálticas en esta nueva situación. Actualmente, los esfuerzos se están dirigiendo hacia la consecución de estos objetivos.

2.4. ENSAYOS DE SIMULACIÓN REALIZADOS

SIES 1

El objetivo principal para el que se diseñaron los experimentos SIES 1, 2 y 3 fue el de simular los efectos en un estuario de un evento de contaminación aguda por metales pesados; concretamente, el episodio de contaminación metálica del estuario del Guadalquivir como consecuencia de la rotura de la balsa de residuos mineros de Bolidem-Apirsa en Aznalcóllar.

En estos tres experimentos, además de determinar la contaminación metálica, se caracterizó también el comportamiento de nutrientes (nitrito, nitrato, amonio, fosfato y silicato) a lo largo del estuario.

En todos los experimentos que se describen en esta Memoria (desde SIES 1 hasta SIES 20), se ha establecido también la especiación del sistema del carbónico a lo largo de los gradientes generados y el comportamiento de elementos mayoritarios: Cl^- , Ca^{2+} y SO_4^{2-} (excepto en SIES 20, dada su peculiar idiosincrasia).

De forma previa al diseño de SIES 1, 2 y 3, se estudiaron los gradientes longitudinales de salinidad reales en la zona comprendida entre la desembocadura del Guadalquivir y su confluencia con el río Guadiamar (Sáenz, 1999; Gómez-Parra et al. 2000). Posteriormente, se representaron dichos gradientes a los que se superpuso el gradiente de salinidad que fue utilizado en cada uno de los tres experimentos. En la figura 2.20., se muestran las variaciones de salinidad en función de la distancia en distintos instantes de marea.

Observando la figura se aprecia que en este primer experimento se simuló una situación de marea promedio de todas las registradas en el estuario del Guadalquivir. Por tanto, es el ensayo más representativo de las condiciones hidrodinámicas de la zona.

El agua de río se tomó del propio Guadalquivir, en el término municipal de Coria del Río (Sevilla). El agua de mar se tomó en la bahía de Cádiz.

En un tanque aparte se encontraba el agua tóxica empleada como contaminante y que fue recolectada en la arqueta de entrada de aguas a la depuradora ubicada en el río Guadiamar. Dicho agua se inyectaba en continuo en el primer tanque del equipo mediante una bomba peristáltica.

La relación de caudales empleada fue la siguiente:

$Q_M = Q_2 = \dots = Q_i = \dots = Q_8 = 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $Q_0 = 15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

La duración del experimento fue de ocho días.

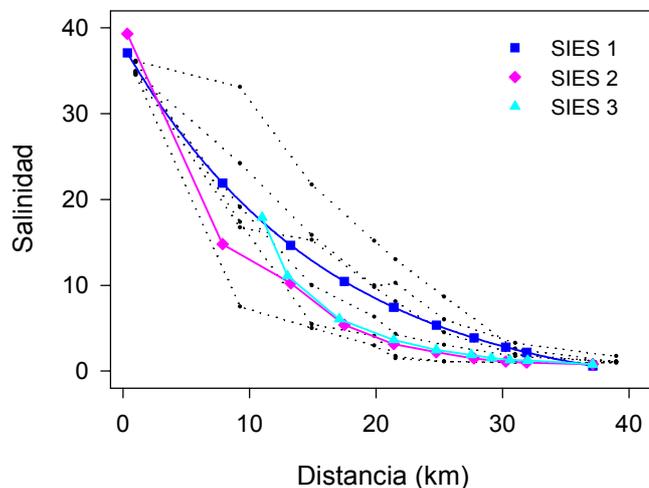


Figura 2.20. Gradientes longitudinales de salinidad reales medidos en el estuario del Guadalquivir para distintos instantes de marea (en trazo discontinuo), representados junto con los gradientes simulados en SIES 1, 2 y 3 (en trazo continuo). La distancia comienza a medirse desde la desembocadura del Guadalquivir. No se ha podido hacer un reposicionamiento por desplazamiento con la marea, al desconocerse el recorrido de la misma.

SIES 2

El segundo ensayo describe una situación de bajamar típica, donde el volumen de agua del estuario es menor, y la influencia del río sobre el sistema debería ser a priori más intensa. Para ello se ha reducido el caudal de entrada de agua de mar al estuario.

La procedencia del agua de mar y de río fue idéntica a la de SIES 1.

La relación de caudales empleada fue la siguiente:

$Q_M = Q_2 = \dots = Q_i = \dots = Q_8 = 15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; $Q_0 = 15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$.

La duración del experimento fue de ocho días.

SIES 3

En este ensayo se realizó un estudio de la zona más fluvial del estuario (valores de salinidad entre 0 y 17), ya que la mayor reactividad de las sustancias se produce precisamente a bajas salinidades. De esta forma, se pueden estudiar más detalladamente los procesos físico-químicos que tienen lugar en dicha zona.

La procedencia del agua de mar y de río fue la misma que en los dos ensayos anteriores. Como lo que se pretendía era realizar una ampliación de la zona más fluvial del estuario, al agua de mar se le añadió agua de río hasta alcanzar una salinidad aproximada de 17.

La relación de caudales empleada fue la siguiente:

$$Q_M = Q_2 = \dots = Q_i = \dots = Q_8 = 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}; Q_0 = 15 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}.$$

La duración del experimento fue de once días.

SIES 4

El objetivo principal para el que se diseñaron los experimentos SIES 4, 5, 6, 7, 8 y 9 fue el estudio de la reactividad del fosfato a través de un gradiente de salinidad.

Además, en los experimentos SIES 6, 7, 8 y 9 también se midieron los flujos de CO_2 agua-atmósfera a lo largo de los respectivos gradientes de salinidad simulados en cada uno de ellos.

En SIES 4 comenzó a utilizarse como agua de río un agua de origen sintético, de concentración conocida. Para ello se empleó agua destilada (milli-Ro) en la que se disolvieron una serie de sales que aseguran una composición típica de un agua de río estándar mundial (Millero, 1992). Las sales empleadas son las siguientes:

NaHCO_3 (0.95 mM)
 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.15 mM)
 K_2SO_4 (0.10 mM)
 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.40 mM)
 Na_2HPO_4 (50 μM)

Los valores entre paréntesis indican las concentraciones finales que las distintas sales poseen en el agua de río sintética.

El agua de mar, procedente de la bahía de Cádiz, se filtró por 1 μm . Se simuló un gradiente de salinidad de valores comprendidos entre 0 y 36.

La relación de caudales empleada fue la siguiente:

$$Q_M = Q_2 = \dots = Q_i = \dots = Q_8 = 20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}; Q_0 = 10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}.$$

La duración del experimento fue de siete días.

SIES 5

Este experimento, prácticamente consistió en una repetición del anterior, sólo que se acidificó el agua de río (mediante adición de HCl) para establecer un gradiente de pH más acusado a lo largo del estuario.

La duración del experimento fue de siete días.

SIES 6

En este experimento se modificó la relación de caudales con respecto a la empleada en SIES 4 y 5, a fin de obtener un gradiente de salinidad comprendido entre unos valores similares a los anteriores sólo que más lineal.

La composición del agua de mar y de río fue idéntica la empleada en SIES 4 y 5. También se acidificó el agua de río.

La relación de caudales empleada fue la siguiente:

$$Q_M = Q_2 = \dots = Q_i = \dots = Q_8 = 30 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}; Q_0 = 10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}.$$

La duración del experimento fue de ocho días.

SIES 7

A diferencia del gradiente simulado en SIES 4, 5 y 6, en este ensayo (al igual que en SIES 8 y 9) se realizó una “ampliación” de la zona más fluvial del estuario, ya que en dicha zona se desarrollan los procesos que se pretenden caracterizar (Bale y Morris, 1981). En este caso el intervalo de salinidad estuvo comprendido entre 0 y 10.

El agua de río tuvo una composición idéntica a la de SIES 4, exceptuando la concentración de fosfato, que se disminuyó de un valor de 50 μM a otro de 10 μM , a fin de adecuarla a un valor más cercano al que se encuentra en condiciones naturales.

El agua de mar se tomó en la bahía de Cádiz y se filtró por 1 μM . Posteriormente se le añadió agua de río sintética (pero carente de fosfato) hasta alcanzar un valor de salinidad en torno a 10.

La relación de caudales empleada fue la siguiente:

$$Q_M = Q_2 = \dots = Q_i = \dots = Q_8 = 20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}; Q_0 = 10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}.$$

La duración del experimento fue de nueve días.

SIES 8

La única diferencia con SIES 7 es que el gradiente de salinidad se restringió de nuevo. El intervalo de salinidad estuvo comprendido entre 0 y 5. El agua de río se acidificó mediante adición de HCl.

La duración del experimento fue de siete días.

SIES 9

Este ensayo prácticamente consistió en una réplica de SIES 7 con la excepción de que se añadió una cierta cantidad de hierro al agua de río (para obtener una concentración de 5 μM), a fin de determinar cómo afecta la presencia de este elemento en la posible formación de apatitos, ya que el hierro compite con el calcio en los procesos de adsorción de fosfato.

La duración del experimento fue de ocho días.

SIES 10

El objetivo principal para el que se diseñaron los experimentos SIES 10, 11 y 12 fue el estudio de la reactividad del fosfato a través de un gradiente de pH. De hecho, en estos tres experimentos, se le dio un nuevo uso al simulador. Fue la primera vez que no se simuló un gradiente de salinidad, sino que se reprodujo un gradiente de pH, a tres salinidades fijas (19, 5 y 37, respectivamente).

Además, en estos tres experimentos, también se midieron los flujos de CO_2 agua-atmósfera a lo largo de los respectivos gradientes de pH simulados en cada uno de ellos.

El agua en SIES 10 tuvo la misma composición que en ensayos anteriores, sólo que se mezcló con agua de mar filtrada hasta alcanzar un valor de salinidad en torno a 19. La composición del agua que entraba por ambos extremos del simulador fue la misma, con la excepción de que el agua que entraba por uno de los extremos se acidificó a fin de provocar el gradiente de pH deseado y se le añadió Na_2HPO_4 para que existiera una concentración de fosfato de 10 μM y poder estudiar así su evolución a lo largo del gradiente de pH

La relación de caudales empleada fue la siguiente:

$$Q_M = Q_2 = \dots = Q_i = \dots = Q_8 = 20 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}; Q_0 = 10 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}.$$

La duración del experimento fue de ocho días.

SIES 11

Este ensayo se desarrolló de idéntica forma que SIES 10, con la excepción de que la salinidad a la que se trabajó estuvo en torno a un valor de 5.

La duración del experimento fue de seis días.

SIES 12

Este ensayo se desarrolló de idéntica forma que SIES 10 y 11, con la excepción de que la salinidad a la que se trabajó estuvo en torno a un valor de 37.

La duración del experimento fue de seis días.

SIES 13

Los experimentos SIES 13, 14, 15, 16 y 17 se diseñaron con el objetivo primordial de caracterizar el comportamiento de un tensioactivo aniónico sintético durante su tránsito por un estuario. En concreto, se caracterizó el comportamiento del sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS) y de sus intermedios de degradación (los ácidos sulfofenilcarboxílicos SPC), por ser el tensioactivo más empleado en los detergentes domésticos e industriales en la Unión Europea.

SIES 13 fue el primero de estos ensayos. En él se realizó un estudio de la adsorción de LAS a lo largo de un gradiente de salinidad completo (0-36).

El agua de río, de nuevo, tuvo origen sintético y se le añadió una concentración conocida de LAS comercial. Por otra parte, el agua de mar se tomó en la bahía de Cádiz.

Puesto que se quería estudiar fenómenos de adsorción de LAS sobre sólidos en suspensión, se añadieron a ambas aguas sólidos para alcanzar una concentración de los mismos en torno a $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

La relación de caudales empleada fue la siguiente:

$$Q_M = Q_2 = \dots = Q_i = \dots = Q_8 = 20 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}; Q_0 = 10 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}.$$

La duración del experimento fue de catorce días.

SIES 14

SIES 14, 15 y 16 constituyeron la segunda batería de experimentos en los que no se simuló un gradiente de salinidad. En este caso, se generó un gradiente de LAS a fin de caracterizar su biodegradación a tres salinidades fijas (37, 18 y 3, respectivamente)

La composición del agua que entró por ambos extremos del simulador fue la misma: agua de mar tomada en la bahía de Cádiz y filtrada por 1 μm . Se añadió una concentración conocida de inóculo bacteriano a fin de favorecer la biodegradación, proceso que se deseaba caracterizar. Dicho inóculo se tomó en un punto de la bahía de Cádiz donde se producen vertidos domésticos sin depurar y, por tanto, existen comunidades bacterianas especializadas en la biodegradación de tensioactivos. La salinidad de trabajo tuvo un valor en torno a 37.

Se preparó una disolución de LAS aparte que se inyectaba en continuo directamente en el primer tanque del equipo para evitar que el LAS comenzara a biodegradarse si se añadía al tanque general que abastecía al simulador.

La relación de caudales empleada fue la siguiente:

$$Q_M = Q_2 = \dots = Q_i = \dots = Q_8 = 36 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}; Q_0 = 6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}.$$

La duración del experimento fue de ocho días.

SIES 15

El diseño de este experimento fue idéntico que el anterior. La única diferencia radicó en la salinidad del agua empleada: agua dulce de origen sintético diluida con agua de mar procedente de la bahía de Cádiz hasta alcanzar una salinidad en torno a 18. El inóculo bacteriano añadido previamente se aclimató a la salinidad de trabajo.

La duración del experimento fue de siete días.

SIES 16

El diseño de este experimento fue idéntico que los dos anteriores. La única diferencia radicó en la salinidad del agua empleada: agua dulce de origen sintético diluida con agua de mar (de la bahía de Cádiz) hasta alcanzar una salinidad en torno a 3. Esta vez, la salinidad fue tan baja que no permitió el uso de inóculo bacteriano de ambiente marino, por lo que se empleó inóculo procedente de la estación depuradora de aguas residuales de Puerto Real (Cádiz). La duración del experimento fue de siete días.

SIES 17

En el último experimento con tensioactivos se pretendió caracterizar, de manera conjunta, adsorción y biodegradación de LAS. Se estableció un gradiente de salinidad completo (entre 2.5 y 37). Al gradiente de salinidad, hay que añadir el correspondiente de LAS y de inóculo bacteriano.

El agua de río fue de origen sintético, mezclada con cierta cantidad de agua salada para alcanzar una salinidad de 2.5. El agua de mar se tomó en la bahía de Cádiz.

Puesto que se quería estudiar fenómenos de adsorción de LAS sobre sólidos en suspensión, se añadieron a ambas aguas sólidos para alcanzar una concentración de los mismos en torno a $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, que es la que se registra en muestreos reales.

Se emplearon dos inóculos bacterianos diferentes. Uno procedente de la bahía de Cádiz, que se inyectó en el tanque más marino del equipo y, otro, de la EDAR de Puerto Real, que se inyectó en el tanque más fluvial.

Se preparó una disolución de concentración conocida de LAS, que se inyectaba en continuo directamente en el tanque más fluvial del simulador.

La relación de caudales empleada fue la siguiente:

$$Q_M = Q_2 = \dots = Q_i = \dots = Q_8 = 15 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}; Q_0 = 7.5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}.$$

La duración del experimento fue de doce días.

SIES 18

El objetivo que se perseguía con este experimento fue establecer la tasa de bioacumulación de determinados metales (Zn, Cd, Pb y Cu) y algunos de sus efectos subletales sobre un molusco bivalvo (*Scrobicularia plana*) sometido a un gradiente de salinidad. Dicho gradiente para este ensayo estuvo comprendido entre valores de salinidad de 10 y 36, a fin de no provocar un choque osmótico excesivo a los bivalvos.

Se sembraron 10 bivalvos por tanque (siguiendo la proporción de un bivalvo por cada litro de agua) y, previamente a la puesta en marcha del experimento, dichos bivalvos estuvieron depurándose durante cinco días en un flujo continuo de agua limpia y oxigenada y se los mantuvo en ayunas, en un tanque de 70 L aparte del simulador. Tras esto, se ubicaron en los ocho tanques, donde se mantuvieron aclimatándose a las respectivas salinidades de cada uno de ellos durante siete días más.

Tras este período de aclimatación, se inyectó en el primer tanque una disolución (preparada en un recipiente independiente) que contenía concentraciones conocidas de Zn, Cd, Pb y Cu, en forma de entrada continua regulada mediante una bomba peristáltica.

El agua de río se consiguió mezclando agua salada con agua destilada (milli-Ro) hasta alcanzar una salinidad en torno a 10. El agua de mar se tomó en la bahía de Cádiz y se filtro por 1 μm .

La relación de caudales empleada fue la siguiente:

$$Q_M = Q_2 = \dots = Q_i = \dots = Q_8 = 36 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}; Q_0 = 6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}.$$

La duración del experimento fue de catorce días.

En la figura 2.21., se presentan todos los gradientes de salinidad simulados en los experimentos desarrollados en régimen estacionario.

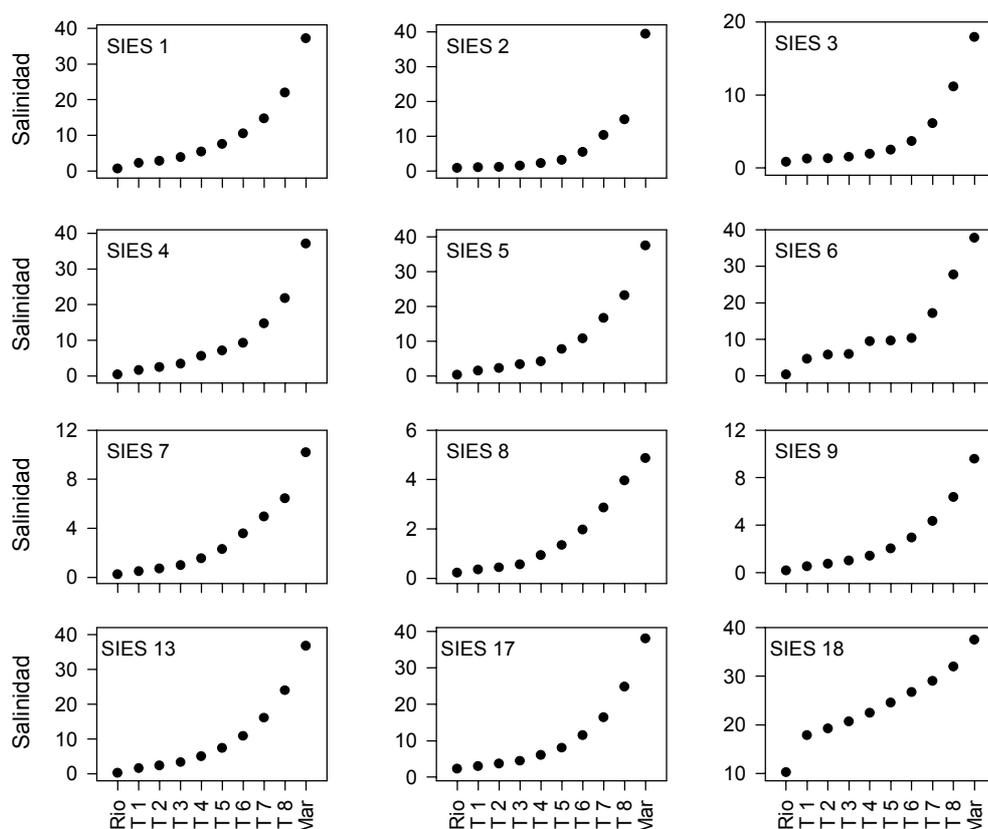


Figura 2.21. Gradientes de salinidad generados en el simulador bajo régimen estacionario. En el eje de abcisas se representan los distintos tanques que integran el equipo (además del río y el mar), mientras que en el eje de ordenadas se representan los valores de salinidad que se midieron en cada uno de los tanques.

SIES 20

El objetivo de SIES 20 fue reproducir un gradiente de salinidad bajo un régimen mareal concreto (en este caso, semidiurno).

El agua de río empleada fue, simplemente, agua destilada (milli-Ro). El agua de mar requería una salinidad en torno a 50, lo que se consiguió mezclando agua de mar procedente de la bahía de Cádiz con la cantidad adecuada de sal procedente de una salina de dicha bahía.

Por limitaciones técnicas, hubo que realizar las siguientes modificaciones en el equipo:

- Disminuir el volumen de los tanques del simulador hasta 5 L.
- Reducir el número de tanque útiles para la experimentación a 5.

En este caso, la relación de caudales empleada fue variando con el tiempo, dado el régimen mareal. Los detalles prácticos y teóricos necesarios para recrear el régimen semidiurno que se presenta en SIES 20, han sido descritos prolijamente en los apartados 2.2.2. a) y 2.3.2. de este mismo capítulo.

La duración del experimento fue de veintidós días.

Estrategia de muestreo

En todos los experimentos descritos se ha seguido el mismo protocolo a la hora de la toma de muestras. Una vez dado por finalizado el experimento, se procedió al muestreo de los tanques que constituyen el simulador, así como los del agua de mar, el agua de río y el del contaminante (en el caso en que éste se introduzca al simulador desde un tanque distinto al del agua de río). Para ello, se paran las bombas y los sistemas de aireación y agitación un mínimo de diez minutos antes.

Las muestras se tomaron en botes de polipropileno previamente lavados con HNO_3 (Grashoff et al., 1983) o con mezcla crómica según lo que se vaya a determinar en la muestra tomada. De cada tanque se tomaron las siguientes muestras:

- Un frasco Winkler para medir oxígeno disuelto.
- Un bote de 100 mL para alcalinidad, (siempre medida en un plazo inferior a tres días)
- Un bote de 250 mL para determinar salinidad y sólidos en suspensión.

- Un bote de 250 mL para determinar elementos mayoritarios (Calcio, Cloruro y Sulfato).
- Cuatro tubos de ensayo de 10 mL para determinar nutrientes (Nitrógeno, Nitrato, Amonio, Fosfato y Silicato).
- El recipiente adecuado para tomar suficiente cantidad de muestra y determinar, en cada grupo de experimentos, el contaminante o sustancia cuyo comportamiento se pretende caracterizar (metales, LAS, etc...)

Inmediatamente después de la toma de muestras, se analizaron aquéllas que necesitan ser determinadas inmediatamente. El resto se almacenaron en oscuridad y en cámara frigorífica o congeladora según sea la temperatura óptima de conservación en cada caso hasta el momento del análisis.

Antes de cada experimento, y durante el desarrollo del mismo, el agua de mar y de río empleadas se almacenaron en tanques de 200 L, incluso de 400 L si la duración de las pruebas así lo requería. Durante todo ese tiempo, ambos tipos de agua se conservaron filtradas (excepto en los ensayos que esto no interesaba), en oscuridad, aireadas y en continua agitación, de tal manera que se asegurase una mezcla homogénea, al igual que en los tanques.

2.5. BIBLIOGRAFÍA

Bale, A.J., Morris, A.W. 1981. Laboratory simulation of chemical processes induced by estuarine mixing: the behaviour of iron and phosphate in estuaries. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 13:1-10.

Beer, T. 1983. En: *Environmental Oceanography*. Pergamon Press, Oxford. pp:226.

Bilinski, H., Kozar, S., Plavsic, M., Kwokal, Z., Branica, M. 1991. Trace metal adsorption on inorganic solid phases under estuarine conditions. *Mar. Chem.*, 32: 225-233.

Chung-Chi Chen, J.E., Petersen, W.M. 2000. Nutrient uptake in experimental estuarine ecosystems: scaling and partitioning rates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 200: 103-116.

Gómez-Parra, A., DelValls, T.A., Forja, J.M., Sáenz, I., Riba, I. 2000. Early contamination by heavy metals of the Guadalquivir estuary after the Aznalcóllar mining spill (SW Spain). *Mar. Pol. Bull.*, 40(12): 1115-1123.

Gordeev, V.V., Sidorov, I.S. 1993. Concentration of major elements and their outflow into the Laptev Sea by the Lena River. *Mar. Chem.*, 43: 33-46.

Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K. 1983. *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, R.F.A.

Hosawaka, I., Ohshima, F., Kondo, N. 1970. On the concentrations of the dissolved chemical elements in the estuary of the Chikugogawa River. En: *Estuarine Chemistry* (J.D. Burton y P.S. Liss, eds.). Academic Press, London, pp: 93-127.

Levenspiel, O. 1972. *Chemical Reaction Engineering*. J. Wiley and Sons, New York. 512 pp.

Millero, F.J., Sohn, M.L. (eds.). 1992. En *Chemical Oceanography*. CRC Press, Boca Raton (USA). pp: 59-114.

Ortega, T. 1996. *Caracterización de la Reactividad de Especies Químicas en Estuarios Mediante Técnicas de Simulación*. Tesis de Licenciatura. Universidad de Cádiz. 149 pp.

Ortega, T., Forja, J.M., Gómez-Parra, A. 2001. Teaching estuarine chemical processes by laboratory simulation. *J. Chem. Educ.*, 78(6): 771-775.

Preston, M.R., Riley, J.P. 1982. The interactions of humic compounds with electrolytes and three clay minerals under simulated estuarine conditions. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 14: 576-576.

Sáenz, I. 1999. Transporte y reactividad de Zn, Cd, Pb y Cu en el estuario del Guadalquivir tras el accidente minero de Aznalcóllar. Tesis de Licenciatura. Universidad de Cádiz. 129 pp.

Smith, J.D., Longmore, A.R. 1980. Behaviour of phosphate in estuarine water. *Nature*, 287: 532-534.

St. Clair, D. W. 1989. Sintonizado de Controladores y Comportamiento del Lazo de Control. Ed: Tiempo Real, Barcelona. 45 pp.

Turner, A., Millward, G.E., Bale, A.J., Morris A.W. 1993. Application of the K_d concept to the study of trace metal removal and desorption during estuarine mixing. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 36: 1-13.

3. COMPORTAMIENTO DEL SISTEMA DEL CARBONO INORGÁNICO EN ESTUARIOS

3.1. INTRODUCCIÓN

3.1.1. El sistema del carbono inorgánico en el agua de mar

La concentración de un gas en disolución (C_i) se encuentra relacionada con su presión parcial (P_i) a través de la ley de Henry:

$$P_i = k_i \cdot C_i \quad [1]$$

donde k_i es la constante de Henry y depende de la naturaleza del gas, de la salinidad, de la temperatura y de la presión total. La lámina de agua superficial generalmente se encuentra en equilibrio con la atmósfera, de forma que la presión parcial del gas en disolución es igual que en la fase gaseosa:

$$P_i (\text{disolución}) = P_i (\text{gas}) \quad [2]$$

La solubilidad (*C_i) se define como la concentración del gas en equilibrio con la atmósfera para una presión total de 1 atm y grado de humedad del 100%, y viene dada por:

$$^*C_i = P_i (\text{gas}) / k_i \quad [3]$$

La dependencia de la solubilidad de un gas con la temperatura y la salinidad ha sido determinada experimentalmente en estudios de laboratorio. Cuando no existe reacción química entre el gas soluto y el disolvente, esa dependencia puede ser usada para calcular la solubilidad de un gas en una determinada masa de agua de mar. Sin embargo, el CO_2 es reactivo en el agua de mar y, debido a estas reacciones (hidrólisis y disociaciones), un cambio de temperatura o salinidad también implica cambios en el equilibrio químico. Con el fin de determinar únicamente la solubilidad del CO_2 , los trabajos experimentales se han llevado a cabo en disoluciones acidificadas ($\text{pH}=2$), de forma que el CO_2 constituye la única especie de carbono inorgánico presente en el agua de mar.

La variación de la solubilidad de un gas con la temperatura ha sido descrita por varias expresiones matemáticas. En concreto, para describir el coeficiente de solubilidad del CO_2 en función de la salinidad y de la temperatura, se han empleado distintas ecuaciones empíricas. La UNESCO sugiere la utilización de la propuesta por Weiss (1974):

$$\ln \alpha = A_1 + A_2 (100/T) + A_3 \ln (T/100) + S [B_1 + B_2 (T/100) + B_3 (T/100)^2] \quad [4]$$

$$\begin{array}{ll} A_1 = -60.2409 & B_1 = 0.023517 \\ A_2 = 93.4517 & B_2 = -0.023656 \end{array}$$

$$A_3 = 23.3585 \quad B_3 = 0.0047036$$

(donde α es la solubilidad del gas expresada en moles·Kg⁻¹·atm⁻¹, T es la temperatura absoluta y S, la salinidad).

Las reacciones en las que interviene el dióxido de carbono en el agua de mar pueden presentarse por el conjunto de equilibrios que se expone a continuación: Cuando el CO₂ se disuelve en el agua, reacciona en su mayor parte con las especies iónicas y, sólo una pequeña fracción (menor al 1%) permanece en la disolución como gas disuelto. La reacción de disolución es:



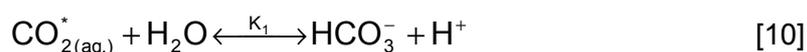
El CO₂ disuelto reacciona con el agua (reacción de hidratación) para formar ácido carbónico [6], el cual se disocia a bicarbonato [7]



y, por último, el bicarbonato se disocia a carbonato [8]:



La constante de hidratación (K_H) del dióxido de carbono tiene un valor relativamente bajo, en torno a $2 \cdot 10^{-3}$, y, por tanto, sólo un 0.2% del CO₂ disuelto se encuentra como H₂CO₃ a la salinidad y el pH del agua de mar. Así, generalmente se suele considerar la suma de las concentraciones de CO_{2(aq.)} y H₂CO₃ como una única especie hipotética, CO_{2(aq.)}^{*}. Según esto, las ecuaciones [5], [6] y [7] pueden expresarse como:



Las constantes de equilibrio de estas reacciones son las siguientes:

$$K_0 = [\text{CO}_{2(\text{aq.})}^*] / p\text{CO}_2 \quad [11]$$

$$K_1 = [\text{HCO}_3^-] \cdot [\text{H}^+] / [\text{CO}_{2(\text{aq.})}^*] \quad [12]$$

$$K_2 = [\text{CO}_3^{2-}] \cdot [\text{H}^+] / [\text{HCO}_3^-] \quad [13]$$

donde K_0 es la solubilidad del CO_2 y, K_1 y K_2 , la primera y segunda constantes de disociación del carbónico, respectivamente. Existen diferentes ecuaciones empíricas para expresar la dependencia de estas constantes con la temperatura y la salinidad. En lo que respecta a K_0 , la ecuación de Weiss (1974) es la más utilizada. La expresión sería la misma que la ecuación [4], teniendo presente que, en este caso, la solubilidad no se representa por " α " sino por " K_0 ".

Disponer de valores exactos de las constantes de disociación del carbónico (K_1 y K_2) en el agua de mar tiene un gran interés, pues son necesarias para calcular la especiación del sistema del carbono inorgánico a partir de las medidas experimentales. Existen distintas expresiones de tales constantes y su elección es muy importante al repercutir en los valores calculados de las concentraciones de HCO_3^- , CO_3^{2-} y CO_2 . Actualmente, no existe consenso sobre los valores de las constantes a utilizar, ya que son varias las que se han propuesto. En la Tabla 3.1. se presenta un compendio de las distintas constantes de equilibrio del sistema del carbono inorgánico. Más adelante se comentan las que se han usado y por qué.

3.1.2. Cálculo de la especiación del sistema del carbono inorgánico

Las concentraciones de las distintas especies del sistema del carbono inorgánico no se pueden medir directamente. Sin embargo, se pueden obtener a partir de la medida de cuatro variables experimentales, (Alcalinidad total (A_T), carbono inorgánico total disuelto (CID), presión parcial de CO_2 ($p\text{CO}_2$) y pH), y la utilización de constantes termodinámicas. Para caracterizar el sistema del carbono inorgánico son necesarias, al menos, dos de estas cuatro variables (Park, 1969; Millero, 1995).

1. La *alcalinidad total*, en esencia, consiste en la medida de la cantidad de un ácido fuerte que es necesaria para transformar en CO_2 todo el carbono inorgánico presente en el medio. La determinación experimental de la alcalinidad total en el agua de mar, generalmente se realiza mediante una valoración potenciométrica utilizando un electrodo combinado de vidrio.

2. El *carbono inorgánico disuelto total* (CID) se define como la suma de las concentraciones de HCO_3^- , CO_3^{2-} y CO_2^* . La concentración de CID en el agua de mar se puede determinar mediante técnicas coulombimétricas (Johnson et al., 1987).

Tabla 3.1. Constantes de equilibrio del sistema del carbónico (adaptada de Murphy, 1996).

Constante	Fórmula	Referencia	Matriz (1)	Escalas de pH (2)	Escala de concentración	Precisión estimada
K_0	$K_0 = \text{Exp} [-60.241 + 93.452 (100/T) + 23.359 \ln(T/100) + S [0.0235 - 0.0237(T/100) + 0.00470 (T/100)^2]]$	Weiss (1974)	Agua de mar	N/A	mol (kg sol)^{-1} atm^{-1}	0.012×10^{-2}
K_1	$K_1 = \text{Exp} [851.4/T + 3.237 - 0.0106 S + 0.000105 S^2]$ $K_1 = \text{Exp} [3670.7/T - 62.008 + 9.794 \ln(T) - 0.0118 S + 0.000116 S^2]$ $K_1 = \text{Exp} [845/T + 3.248 - 0.098 S + 0.000087 S^2]$ $K_1 = \text{Exp} [807.18/T + 3.374 - 0.00175 S \ln(T) + 0.00095 S^2]$ $K_1 = \text{Exp} [2.83655 - 2307.1266/T - 1.5529413 \ln(T) + (-0.20760841 - 4.0484/T) S^{0.5} + 0.08468345 S - 0.00654208 S^{1.5}]$ $K_1 = \text{Exp} [3633.86/T - 61.2172 + 9.6770 \ln(T) - 0.011555 S + 0.0001152 S^2]$	Hanson (1973) Mehrbach et al. (1973) Dickson y Millero (1987) Goyet y Poisson (1989) Roy et al. (1993)	Sintética (sin K) Agua de mar Agua de mar y sintética Sintética (S) Sintética	*H _T *NBS *H _{SWS} *H _{SWS} H _T	mol (kg sol)^{-1} mol (kg sol)^{-1} mol (kg sol)^{-1} mol (kg sol)^{-1} mol kg^{-1}	$0.010 \text{ en } \text{p}K_1$ $0.010 \text{ en } \text{p}K_1$ --- $0.010 \text{ en } \text{p}K_1$ $0.004 \text{ en } \ln K_1$
K_2	$K_2 = \text{Exp} [-0.0192 3885.4/T + 125.844 - 18.141 \ln(T) + 0.000132 S^2]$ $K_2 = \text{Exp} [1394.7/T + 4.777 - 0.0184 S + 0.000118 S^2]$ $K_2 = \text{Exp} [1377.3/T + 4.824 - 0.0185 S + 0.000122 S^2]$ $K_2 = \text{Exp} [1486.6/T + 4.491 - 0.00412 S \ln(T) + 0.000215 S^2]$ $K_2 = \text{Exp} [-9.226508 - 3351.6106/T - 0.2005743 \ln(T) + (-0.106901773 - 23.9722/T) S^{0.5} + 0.1130822 S - 0.008469341 S^{1.5}]$ $K_2 = \text{Exp} [471.78/T + 25.9290 - 3.16967 \ln(T) - 0.01781 S + 0.0001122 S^2]$	Hansson (1973) Mehrbach et al. (1973) Dickson y Millero (1987) Goyet y Poisson (1989) Roy et al. (1993) Lueker et al. (2000)	Sintética (sin K) Agua de mar Agua de mar y sintética Sintética (S) Sintética Agua de mar	*H _T *NBS *H _{SWS} *H _{SWS} H _T *H _T	mol (kg sol)^{-1} mol (kg sol)^{-1} mol (kg sol)^{-1} mol (kg sol)^{-1} mol kg^{-1} mol (kg sol)^{-1}	$0.020 \text{ en } \text{p}K_2$ $0.020 \text{ en } \text{p}K_2$ --- $0.020 \text{ en } \text{p}K_2$ $0.006 \text{ en } \ln K_2$ $0.010 \text{ en } \text{p}K_2$

(1). La matriz se refiere a la solución en la que fueron determinadas las constantes de equilibrio. Sintética: Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻, SO₄²⁻. Sintética (S): sintética + F⁻, Br⁻ y Sr²⁺. Dickson y Millero (1987) consiste en una recopilación de datos anteriores. (2). Las escalas de pH indicadas son aquellas en las que se determinaron originalmente estas constantes: la escala NBS (National Bureau of Standard), escala total del ión Hidrógeno (H_T) y la escala de agua de mar (H_{SWS}). Las constantes que fueron corregidas a la escala total del ión Hidrógeno se han indicado con el superíndice *. La escala de pH no es aplicable (N/A) a K₀ ya que fue determinada a pH=2.

3. La *presión parcial de CO₂* en el agua de mar que está en equilibrio con la atmósfera ($p\text{CO}_2$), se define como:

$$p\text{CO}_2 = X_{\text{CO}_2} \cdot p = K_0 \cdot (\text{CO}_2_{(\text{aq.})}) \quad [14]$$

donde X_{CO_2} es la fracción molar de CO₂ en la atmósfera, p , la presión total, K_0 , la constante de solubilidad y, $(\text{CO}_2_{(\text{aq.})})$, la concentración de CO₂ en agua.

La $p\text{CO}_2$ en el agua se determina mediante compensadores, los cuales son dispositivos que ponen en contacto una muestra de agua de mar con una fase gaseosa de composición conocida y a temperatura controlada. La presión parcial de CO₂ se obtiene a partir de medidas de la concentración de CO₂ en el gas mediante un analizador de gases por infrarrojos (IRGA) o mediante cromatografía de gases. En estos cálculos se asume que el CO₂ se comporta como un gas ideal en un intervalo de condiciones de operación usual (presión total \approx 1 atmósfera, presión parcial de CO₂ de 200 a 1500 μatm , y temperatura de 0 a 30° C) y el error que se comete es menor al 0.5% (Murphy, 1996). El suponer que el CO₂ se comporta como un gas ideal en las condiciones típicas de sistemas naturales no introduce una gran incertidumbre.

4. Las escalas de *pH* y el estudio de las reacciones de transferencia de protones en el agua de mar constituye en la actualidad uno de los temas más confusos de la química marina (Dickson, 1981). Sin duda, ello se debe a que se usan simultáneamente en la actualidad tres escalas de pH distintas para expresar la concentración de los iones hidrógeno, y a la que corresponden, a su vez, tres definiciones distintas de las constantes de disociación de una especie protolítica determinada. El pH se puede determinar potenciométricamente mediante valoradores automáticos.

Tradicionalmente se ha utilizado la medida del pH y de la A_T para estudiar el sistema del carbono inorgánico en agua de mar. Los avances tecnológicos, tales como la técnica coulombimétrica para determinar el CID (Johnson et al., 1987) y de la cromatografía de gases para determinar la $p\text{CO}_2$ (Wanninkhof y Thoning, 1993) han aumentado la posibilidad de establecer la especiación del carbono inorgánico de una forma más directa y con una mayor precisión. No obstante, a pesar de todos estos avances, la determinación potenciométrica sigue siendo actualmente la más utilizada a escala mundial.

Por tanto, en esta Memoria, las dos variables utilizadas en todos los experimentos para estudiar el sistema del carbono inorgánico han sido el pH y la alcalinidad total. Como las

muestras son estuáricas, se ha utilizado la escala de pH NBS y las constantes de disociación de Mehrbarch et al. (1973), que son las que mejor funcionan a valores de salinidad estuáricos (Tabla 3.1.).

De la expresión de la alcalinidad total (A_T), se deduce la alcalinidad de carbonatos (A_C), expresada como:

$$A_C = A_T - [B(OH)_4^-] = [HCO_3^-] + 2 \cdot [CO_3^{2-}] \quad [15]$$

Combinando A_C con K_0 , K_1 y K_2 , y con el pH (de donde se obtiene $[H^+]$), puede establecerse la especiación completa del sistema del carbono inorgánico, empleando las siguientes expresiones (tomadas de Millero, 1992):

$$[HCO_3^-] = A_C / (1 + 2 \cdot K_2 / [H^+]) \quad [16]$$

$$[CO_3^{2-}] = A_C \cdot K_2 / ([H^+] + 2 \cdot K_2) \quad [17]$$

$$[CO_2] = (A_C \cdot [H^+] / K_1) / (1 + 2 \cdot K_2 / [H^+]) \quad [18]$$

$$pCO_2 = K_0 \cdot [CO_2] \quad [19]$$

$$C.I.D. = [HCO_3^-] + [CO_3^{2-}] + [CO_2] \quad [20]$$

3.1.3. Ciclo del CO_2 en zonas costeras

En relación con el ciclo global del carbono, las zonas costeras (entre las que se incluyen los sistemas estuáricos) presentan un interés especial. De hecho, para comprender el balance global del ciclo del carbono, es necesario conocer los procesos que ocurren y los flujos que se producen en las áreas costeras (Walsh, 1991). Estas zonas se consideran cada vez más como un compartimento diferenciado del ciclo biogeoquímico del carbono inorgánico y son reconocidas por algunos autores como “océanos litorales”.

Dentro del ciclo del carbono en las zonas costeras, puede apreciarse la importancia de la entrada de carbono inorgánico y carbono orgánico desde los sistemas terrestres. Estos aportes se producen, fundamentalmente, a través de los estuarios y presentan importantes variaciones estacionales (Gatusso et al., 1998) que dependen fundamentalmente del caudal del río y de la cantidad de carbono que haya disuelto en sus aguas.

Este carbono procede fundamentalmente de la propia cuenca del río, de la atmósfera y de los continentes. Estos últimos aportan carbono proveniente del desgaste químico de las rocas, que se ve favorecido por la reacción con el CO₂ atmosférico. De hecho, se estima que, actualmente, la velocidad de sedimentación en las zonas costeras es probablemente dos veces superior a la de épocas preindustriales debido al aumento de la erosión continental resultante de la deforestación y los cambios que han experimentado las prácticas agrícolas (Wollast, 1991).

En diferentes estudios se ha comprobado que los ríos y los estuarios presentan una cierta sobresaturación de CO₂ respecto a la atmósfera, con unas presiones parciales que varían entre 500 y 9500 μ atm (Martins y Probst, 1991; Frankignoulle et al., 1996; Raymond et al., 1997; Frankignoulle et al., 1998).

El CO₂ puede presentar importantes variaciones temporales y espaciales dentro de un mismo estuario (Frankignoulle et al., 1998; Abril et al., 2000; Howland et al., 2000) debido a la complejidad hidrodinámica y geomorfológica de estas zonas litorales.

En este sentido, Frankignoulle et al. (1998) incluso observaron que la parte más fluvial del estuario del Scheldt puede actuar como una fuente de CO₂ a la atmósfera, mientras que la más salina, donde la producción primaria suele ser muy intensa debido a la disponibilidad de nutrientes, puede comportarse como un sumidero de CO₂ atmosférico. En este mismo estudio se comprobó que los flujos de CO₂ en la parte más salina eran de un orden de magnitud inferior a los de la parte más fluvial, y que esta parte externa del estuario se encontraba sobresaturada de CO₂ la mayor parte del año. No obstante, aún existe una gran controversia sobre si los estuarios actúan como fuentes o como sumideros de CO₂ a la atmósfera (Walsh, 1991; Smith y Hollibaugh, 1993). Esta incertidumbre se debe, además de a la gran heterogeneidad de estas zonas, a que los estudios sobre CO₂ en las zonas estuáricas han estado limitados a transectos aislados o a campañas en barco, que cubren un corto período de tiempo.

El CO₂ está estrechamente vinculado con la actividad de la biota a través de la fotosíntesis y la respiración y es, también, un gas con efecto invernadero, por lo que su intercambio aire-agua supone una cuestión importante en el estudio del cambio climático. La parte más costera del océano (en la que se incluyen los sistemas estuáricos), que comprende un área pequeña pero que experimenta unos importantes flujos atmosféricos de CO₂, juega un papel muy importante a la hora de determinar si el océano en su conjunto es autotrófico o heterotrófico (Smith y Hollibaugh, 1993; Kempe, 1995). Debido a

todo esto, los flujos, fuentes y mecanismos de transporte y transformación de CO₂ se encuentran entre los temas actuales más importantes en biogeoquímica marina y dulce (Smith y Hollibaugh, 1993; Kempe, 1995). Sin embargo, aún existe poco conocimiento de las fuentes más importantes (además de las fluviales) y de los procesos que determinan los flujos de carbono inorgánico a la zona costera del océano (Cai y Wang, 1998).

El procedimiento más generalizado para la cuantificación de los flujos de CO₂ consiste en calcularlos a partir de las diferencias de las presiones parciales de CO₂ entre el agua y la atmósfera y de los coeficientes de transferencia en función de la velocidad del viento de la siguiente manera:

$$F = k \cdot \alpha \cdot \Delta p\text{CO}_2 \quad [21]$$

expresión propuesta por Liss y Merlivat (1986), donde F es el flujo de CO₂ (mmol·m⁻²·d⁻¹), k es el coeficiente de transferencia de gases (cm·h⁻¹), α es la solubilidad del CO₂ (mmol·k⁻¹·atm⁻¹; Weiss, 1974) y ΔpCO₂ (atm) es la diferencia de presiones parciales entre el agua superficial y la atmósfera.

Desafortunadamente, el grado de incertidumbre asociado a estos cálculos es frecuentemente superior al 50% (Goyet y Brewer, 1993), como consecuencia de imprecisiones en los valores de los coeficientes de transferencia (Watson et al., 1991b) y en la temperatura real en la lámina de agua más superficial (Robertson y Watson, 1992). Además, la validez de los flujos así obtenidos está limitada a una escala de tiempo corta, ya que la diferencia de presiones parciales y la velocidad del viento (necesaria para calcular los coeficientes de transferencia), se miden en un instante determinado y no son representativas de situaciones estacionales o anuales. Como consecuencia, dado este elevado número de factores que afectan a los flujos de CO₂ entre el agua de mar y la atmósfera, y la dificultad de modelar la influencia de todos ellos de forma simultánea en sistemas naturales, es frecuente la utilización de dispositivos controlados en laboratorio (como el descrito en esta Memoria) donde poder fijar la mayor parte de estos factores con la finalidad de obtener relaciones simples que describan parcialmente el proceso de transferencia.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. Determinación de la presión parcial de CO₂ en el agua.

Para obtener la presión parcial de CO₂ en agua, es preciso la determinación de la alcalinidad total y del pH de la misma y, a partir de ambas variables, calcular la especiación del CID.

1. La determinación de la alcalinidad se realizó por medio de una valoración potenciométrica con HCl 0.1 M. Se utilizó un valorador automático (Metrohm 670), provisto de un dosificador automático (716 DMS). Las medidas de los potenciales fueron realizadas con un electrodo combinado de vidrio (Metrohm ref. 6.0210.100).

2. La determinación del pH también se realizó de forma potenciométrica, por medio de un valorador automático (Metrohm 670 y 716 DMS). En todos los experimentos, se determinó el pH en la escala NBS (para calibrar el valorador se emplearon soluciones tampón de pH: 4.00 y pH: 7.02).

3. Especiación del CID. Se empleó un programa de cálculo iterativo para obtener, primeramente, el valor de la alcalinidad total. Este programa optimiza, mediante la aplicación de funciones de Gran, el contenido de carbono inorgánico en las muestras y el potencial estándar del electrodo (Ortega, 1996). El algoritmo matemático de cálculo contempla la influencia de los principales equilibrios ácido-base sobre el valor de la concentración de carbono inorgánico. Posteriormente, con el valor de A_T y del pH, se obtienen las concentraciones de HCO₃⁻, CO₃²⁻, CO₂ y la pCO₂ en el agua (ver apartado 3.1.2., ecuaciones [16] a [20]).

3.2.2. Determinación de presión parcial de CO₂ en el aire.

Para la medida de la presión parcial de CO₂ en aire se ha utilizado un analizador de gases por infrarrojos no dispersivo, denominado IRGA (InfraRed Gas Analyzer), de la casa LICOR (Li-6262).

El registro continuo de la concentración de CO₂, vapor de H₂O, presión total y temperatura del aire contenido en la cámara aérea de cada uno de los tanques que componen el simulador se realizó recirculando dicho aire por medio de una bomba peristáltica (Masterflex 7518-62) a través del equipo de análisis del CO₂ (IRGA), equipado

con sensores de presión parcial de H₂O, presión total y temperatura. Esta información se registra cada minuto por medio de un ordenador personal.

Las medidas de CO₂ y H₂O están basadas en la diferencia de absorción de la radiación infrarroja (IR) que atraviesa dos celdas, a través de las que fluyen dos gases, uno cuya composición se desea determinar y otro de concentración de CO₂ y H₂O conocida. La radiación IR es transmitida a través de la trayectoria de ambas celdas, de forma que la señal producida por el analizador es proporcional a la diferencia de absorción entre ambas.

El analizador está compuesto por una fuente de infrarrojos y dos celdas chapadas en oro para aumentar la reflexión de IR, una por donde circula el gas que se desea analizar y otra para el gas de referencia. Posee dos detectores (uno para el CO₂ y otro para el H₂O), que consisten en una placa sólida de seleniuro de plata, que dota al analizador de un mecanismo que lo hace insensible a las vibraciones y que actúa aproximadamente como un contador lineal de cuantos. Para seleccionar la longitud de onda de absorción del CO₂ a 4.26 μm, el detector cuenta con un filtro óptico de paso de banda de 150 nm, y otro filtro de paso de banda de 50 nm para la absorción del H₂O a 2.59 μm.

El nivel de ruido para el CO₂ es de 0.3 ppm (para 350 ppm) cuando el promedio de señal es de 1 segundo y, para el H₂O, es de 0.002 kPa (para 2 kPa). La precisión del aparato para el CO₂ es de ±1ppm a 350 ppm, y de ±2ppm a 1000 ppm, siendo el intervalo de concentraciones en que puede utilizarse entre 0 y 3000 ppm.

El analizador Li-6262 es capaz de operar en modo absoluto o diferencial, lo cual hace alusión al gas que circula por el canal de referencia. En el modo absoluto, el gas que atraviesa el canal de referencia tiene una concentración cero de CO₂ y de H₂O, mientras que en el modo diferencial el canal de referencia es atravesado por un flujo de gas de CO₂ y de H₂O de concentración conocida. En esta Memoria, se seleccionó el modo absoluto, que requiere de una bomba que recircule el aire a través de un filtro de Mg(ClO₄)₂ y CaO natural, que absorben vapor de agua y CO₂ respectivamente, manteniendo así la concentración cero en el canal de referencia.

El equipo utilizado es sensible a las diferencias de presión entre los canales de muestra y de referencia. Por ello se selecciona el caudal de la bomba peristáltica que introduce el aire en el canal de muestra, hasta que tenga el mismo caudal que la bomba que purga el canal de referencia (Li-6262-04) que es de 0.5 L·min⁻¹.

Respecto a la calibración del aparato, el IRGA incluye una calibración interna de fábrica que consiste en la medida de la señal de voltaje dada por el receptor a varias concentraciones de gas y la aplicación de un polinomio de quinto orden, que relaciona el voltaje con la concentración de gas en la celda de referencia. Esta función es válida únicamente para la temperatura y la presión a la cual fue determinada y una concentración cero en el canal de referencia. Se ha comprobado empíricamente que la temperatura afecta a la concentración del gas de una manera lineal y que la presión afecta también de forma lineal a la salida de voltaje.

Por otro lado, la calibración diaria a la que se somete al IRGA consiste en el ajuste del cero y el máximo debido a que la composición del gas afecta a la absorción infrarroja. El analizador de gases debe ser calibrado con patrones de CO₂ mezclados en aire y no en N₂. De esta forma, la calibración del cero se consigue recirculando con la bomba peristáltica una cierta cantidad de aire que atraviesa un filtro de Mg(ClO₄)₂ y CaO hasta llegar a una concentración de CO₂ y H₂O nula. Para calibrar las concentraciones máximas de CO₂ se utilizan patrones (SEO) de 250 y 525 ppm. Para la calibración de la presión parcial de vapor de agua, se satura un cierto volumen de aire burbujeando agua a través de un difusor. La presión de vapor está relacionada con la temperatura por medio de la expresión de Goff y Gratch (1946):

$$\ln p_0 = -63.536311*(1/T)+34.04926034 - 0.19509874*T+0.000012811805*T^2$$

donde "T" es la temperatura absoluta y "p₀", la presión de vapor de agua (pura) en Pa. De esta forma, puede conocerse la presión parcial de H₂O para calibrar el IRGA.

En cada tanque pueden distinguirse dos zonas: una inferior llena de agua con un volumen de 10L (que equivaldría a la zona del estuario que representa ese tanque) y otra superior con un volumen de 2L que contiene aire (que equivaldría a la atmósfera). Durante las mediciones los tanques fueron sellados, para asegurar su hermeticidad.

Al comienzo de cada ensayo, la concentración de CO₂ en la atmósfera del tanque se redujo (por medio de la inyección de aire sintético exento de CO₂) hasta un valor próximo a 350 ppm (μmol/mol)

En el caso de los experimentos desarrollados con la salinidad en estado estacionario, puede considerarse que el equilibrio entre presiones parciales en agua y aire se alcanzó en todos los casos entre una y dos horas. En el caso de régimen mareal, es preciso hacer varias incubaciones a lo largo de un ciclo de marea completo ya que las

condiciones químicas del estuario varían a lo largo de dicho ciclo. En este caso, el tiempo promedio de cada incubación fue de 35 minutos.

Durante el período de medida, el IRGA envía a un ordenador un registro temporal integrado por las siguientes entradas: CO₂ (μg/g), H₂O (Kpa), Temperatura (°C), Tiempo (s), Presión atmosférica (KPa) y CO₂ (Pa), gracias a las cuales se pueden construir las curvas pCO₂ (aire) frente a tiempo y cuantificar así los flujos de CO₂ aire-agua, como se discute más adelante.

En la Figura 3.1. se presenta un esquema del dispositivo de medida de CO₂ por medio de IRGA en uno de los tanques que integra el simulador.

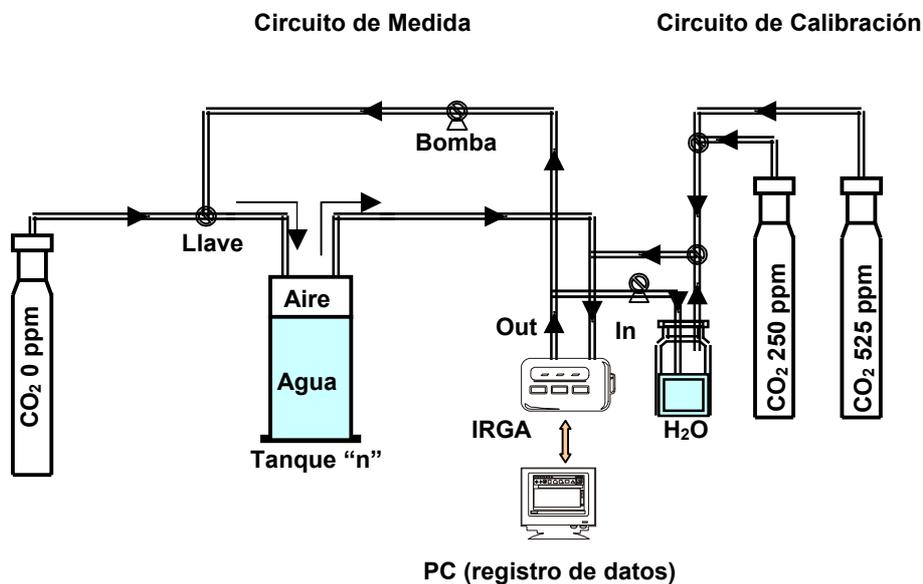


Figura 3.1. Esquema del dispositivo empleado para la determinación de los flujos de CO₂ agua-atmósfera en cada uno de los tanques del simulador. Se especifica tanto el diseño del sistema de calibración del IRGA como el del sistema de medida. Los datos se recogen en continuo por medio de un ordenador personal.

3.2.3. Ensayos realizados

De los experimentos en los que se realizaron medidas con el IRGA en régimen estacionario (SIES 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12), en los cuatro primeros (del 6 al 9), se reprodujeron gradientes de salinidad cada vez más reducidos, ya que se fueron realizando sucesivas "ampliaciones" del gradiente original que se desarrolló en el simulador. En SIES 10, 11 y 12 lo que se hizo fue establecer gradientes de pH entre los distintos tanques del simulador. En cada una de estas simulaciones se mantuvo la

salinidad constante en todos los tanques, si bien su valor fue distinto en cada experimento. Para ello lo que se hizo fue introducir, por ambos extremos del simulador, agua de la misma salinidad, sólo que la que entraba al equipo a través del tanque 1 se acidificaba con HCl hasta que alcanzaba un pH concreto, de tal manera que se generara el gradiente de pH deseado.

Se ha efectuado un único experimento en régimen mareal (SIES 20) en el que se han realizado medidas con el IRGA. En dicho ensayo se reprodujo un gradiente de salinidad, sólo que dicho gradiente variaba con el tiempo, describiendo una variación mareal de tipo semidiurno.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.3.1. Comportamiento del sistema del carbono inorgánico en el agua del estuario

a) Régimen estacionario

Se ha establecido la especiación del sistema del carbono inorgánico en *todos* los experimentos que se presentan en esta Memoria. A partir de los datos experimentales de pH y alcalinidad total, y utilizando las constantes termodinámicas adecuadas, se han obtenido las distintas especies de carbono inorgánico disuelto (HCO_3^- , CO_3^{2-} , CO_2 y pCO_2) con el objeto de caracterizar su comportamiento en los distintos estuarios simulados. En las figuras 3.2., 3.3., 3.4 y 3.5. se presentan los resultados obtenidos.

El comportamiento del carbono inorgánico total en los experimentos descritos en esta Memoria (figura 3.2.) sigue una tendencia similar a la que describieron Raymond et al.(2000). Estos autores realizaron, a lo largo de dos años, medidas de carbono inorgánico disuelto en aguas del estuario del York. Los resultados obtenidos describían un comportamiento conservativo de dicho carbono con la salinidad.

No obstante, el comportamiento del carbono inorgánico en SIES 1, 2 y 3 difiere del comportamiento en el resto de experimentos. El agua del río Guadalquivir se caracteriza por poseer elevadas concentraciones de carbono inorgánico, de forma que existe una disminución de tipo lineal hacia la desembocadura. Este comportamiento, aunque atípico, se encontró en otros sistemas estuáricos, como es el caso del estuario del San Antonio (Benoit et al., 1994). El pH también tuvo un comportamiento atípico con valores más elevados en la zona fluvial estuario y un descenso muy acusado con la salinidad. Ambos

factores determinan la especiación del sistema del carbono inorgánico a lo largo del estuario del Guadalquivir.

En el resto de experimentos, (exceptuando SIES 18), el carbono inorgánico se comporta también de forma conservativa, si bien la tendencia es justo la contraria: la concentración de carbono inorgánico aumenta con la salinidad, hasta llegar a la zona marina, donde se alcanzan los valores más elevados, como sucede en la mayoría de estuarios naturales. El experimento SIES 18 es algo especial, pues fue el único en el que se trabajó con organismos vivos (bivalvos), de tal forma que en la mayoría de variables medidas aparecen desviaciones del comportamiento esperable *a priori*.

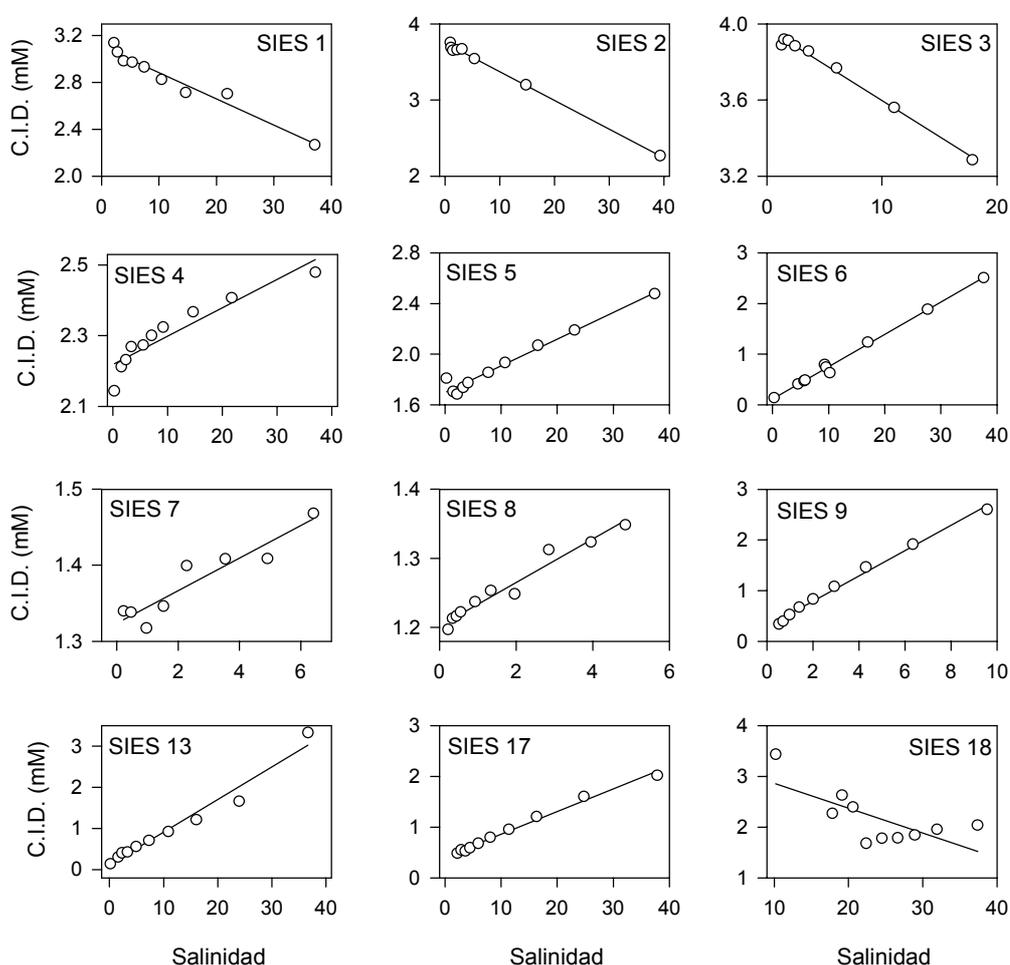


Figura 3.2. Variación de la concentración de carbono inorgánico disuelto a lo largo de todos los gradientes de salinidad simulados en régimen estacionario.

Aunque el carbono inorgánico posee un comportamiento relativamente conservativo, puede observarse una interconversión entre las distintas especies (carbonato,

bicarbonato y dióxido de carbono), motivada por la evolución del pH. De la forma en que éste fluctúe, dependerá la especiación del carbono inorgánico.

En este sentido, la brusca disminución del pH a bajas salinidades en SIES 1, 2 y 3, produce una disminución de la concentración de carbonato, que se va atenuando conforme aumenta la salinidad (describiendo un leve aumento). Este efecto es más acusado en el segundo y tercer ensayos de simulación, para los que se obtuvieron unos descensos más intensos del pH. Es importante incidir en el comportamiento anómalo que presenta el agua del Guadalquivir con respecto al sistema del carbono inorgánico. De hecho, las concentraciones de HCO_3^- y CO_3^{2-} en su zona fluvial son incluso superiores a las que se han encontrado para un agua de mar costera, donde estos elementos son considerados como mayoritarios (figura 3.3.).

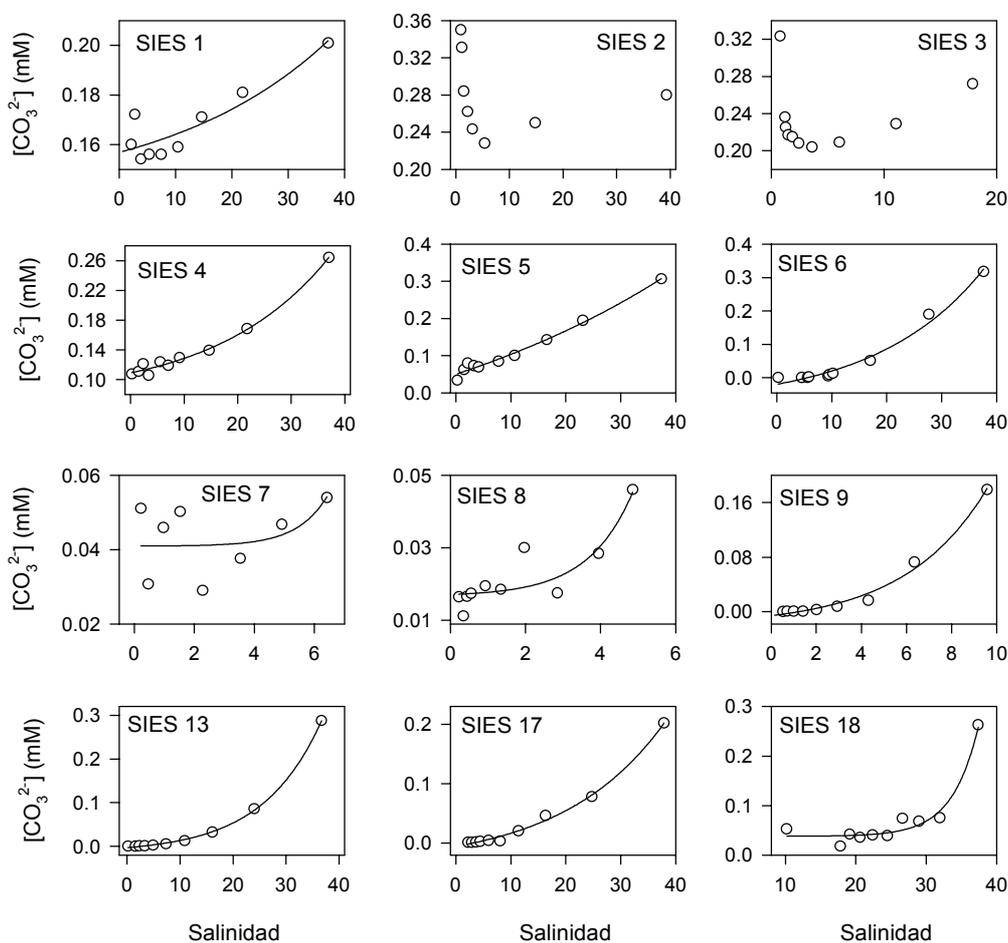


Figura 3.3. Variación de la concentración de carbonato a lo largo de todos los gradientes de salinidad simulados en régimen estacionario.

Por el contrario, en el resto de experimentos (SIES 4 a SIES 18), el carbonato aumenta de forma exponencial con el incremento de salinidad, describiendo unas curvas muy parecidas en la mayoría de los casos. Ello es debido a que, en todos los casos, el pH aumentó con la salinidad, determinando la especiación del sistema del carbono inorgánico. Las concentraciones de CO_3^{2-} a lo largo del gradiente de salinidad, oscilaron en un intervalo de valores más o menos similar (con la salvedad de que SIES 7, 8 y 9 son “ampliaciones” de la zona fluvial del gradiente, por lo que los valores alcanzados son menores que en el resto de experimentos).

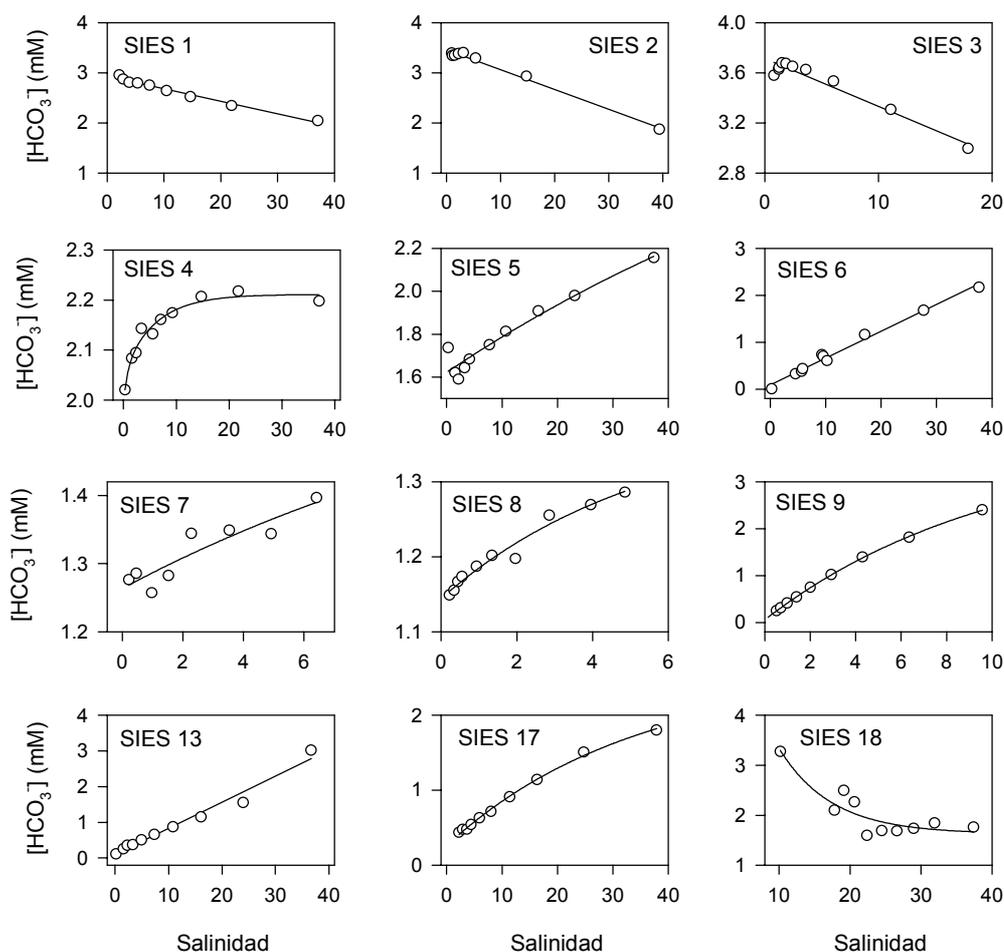


Figura 3.4. Variación de la concentración de bicarbonato a lo largo de todos los gradientes de salinidad simulados en régimen estacionario.

La distinta evolución del pH en SIES 1, 2 y 3 con respecto al resto de experimentos, es la causante de que el bicarbonato también se comporte de manera diferente en estos tres primeros experimentos (figura 3.4). Mientras que en SIES 1, 2 y 3, el bicarbonato decrece con la salinidad de forma prácticamente lineal, en el resto de ensayos la concentración de

HCO_3^- experimenta un aumento levemente exponencial (exceptuando SIES 18, por lo anteriormente comentado). La variación de la concentración de HCO_3^- oscila dentro de un intervalo de valores más o menos similar en todos los casos (con la misma salvedad que para el carbonato en los ensayos SIES 7, 8 y 9).

Debido a que CO_2 y pCO_2 son magnitudes relacionadas de forma directa por medio de la solubilidad (ecuación [14] o [19], apartado 3.1.2.), ambas experimentan una evolución similar con la salinidad. De ahí que, en esta Memoria, sólo se comente la variación de la pCO_2 por ser, de las dos, la variable implicada directamente en los flujos de CO_2 agua-atmósfera.

Aunque actualmente existen pocos datos disponibles, se ha comprobado que los estuarios muestran una sobresaturación de CO_2 con respecto a la atmósfera (Kempe, 1982; Raymond et al., 1997, 2000; Frankignoulle et al., 1998; Boehme et al., 1998; Abril et al., 2000). De hecho, se han encontrado valores de pCO_2 en agua en torno a 5000 μatm , que es varias veces superior al valor medio actual de la pCO_2 en la atmósfera (365 μatm) (Frankignoulle y Borges, 2001). Estos valores tan elevados de pCO_2 son el resultado de complejos procesos fisicoquímicos y biológicos que caracterizan la dinámica estuárica, complicados a su vez por la acción antropogénica.

En la figura 3.5. se presenta la evolución de la pCO_2 en el agua a lo largo del gradiente de salinidad en todos los experimentos realizados.

La pCO_2 también experimenta una variación inducida por los cambios de pH y de la concentración de carbono inorgánico, de ahí que existan de nuevo dos tipos de evoluciones distintas: por un lado, SIES 1, 2, 3 y 4, donde la pCO_2 aumenta de forma exponencial hasta un máximo de 650 μatm aproximadamente, correspondiente con un valor de salinidad en torno a 10, a partir del que inicia una disminución hasta el final del gradiente.

Por otro lado, en el resto de experimentos (SIES 5 a 18), al igual que reseñan Frankignoulle et al. (1998), la pCO_2 en agua decrece con el aumento de salinidad. No obstante, como señalan estos mismos autores, el decrecimiento de pCO_2 con la salinidad puede ser muy diferente de un estuario a otro debido a la conjunción de los procesos físicos, químicos y biológicos que caracterizan la dinámica específica de cada sistema estuárico. De cualquier forma, en todos los casos, los valores cuantificados también presentaron sobresaturación de CO_2 con respecto al promedio atmosférico (365 μatm).

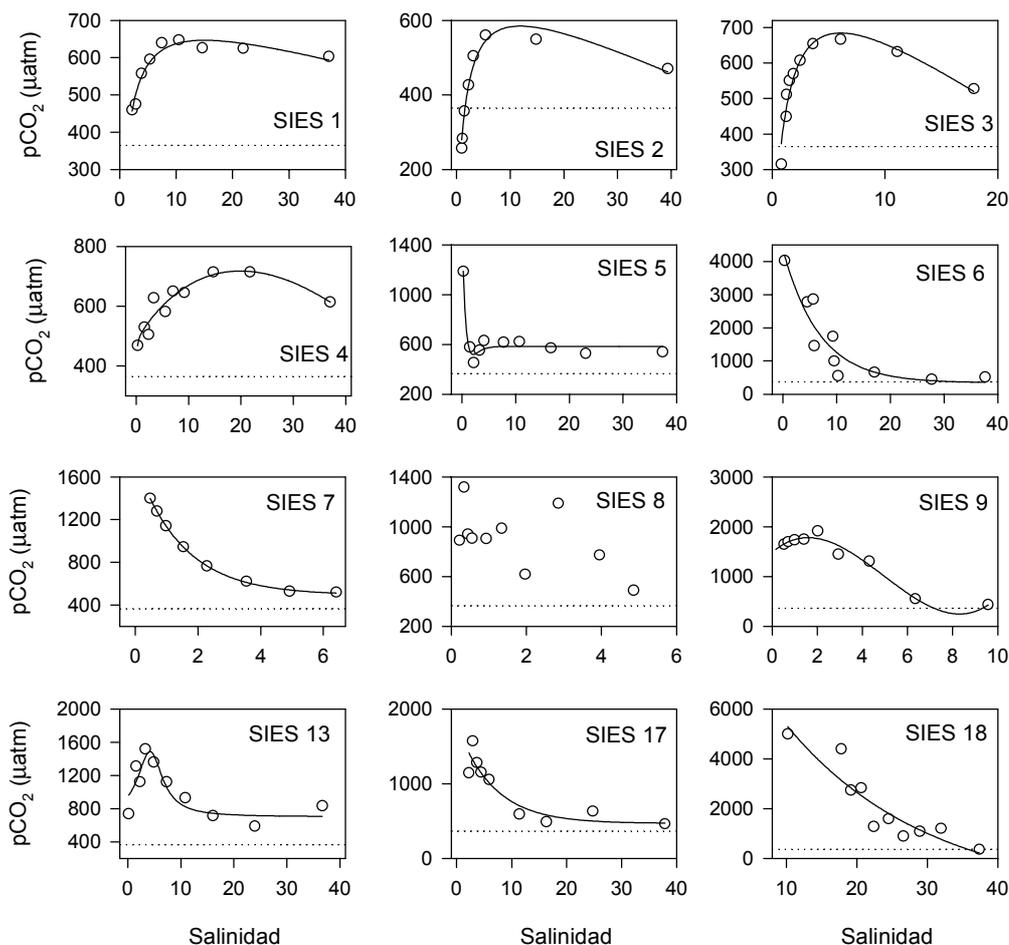


Figura 3.5. Variación de la presión parcial de CO₂ en el agua a lo largo de todos los gradientes de salinidad simulados en régimen estacionario. En trazo discontinuo se presenta el valor medio actual de la pCO₂ en la atmósfera (365 µatm).

b) Régimen mareal

En los experimentos anteriores (desde SIES 1 a SIES 18) se determinó la evolución de la concentración de carbono inorgánico frente a la salinidad a partir de las medidas de la alcalinidad total y del pH en cada uno de los tanques. Se tomó una muestra de agua al finalizar cada experimento para analizar ambas variables, considerando que dichas muestras eran representativas, pues se trabajaba en régimen estacionario. En el caso de régimen mareal no fue posible medir la alcalinidad total a lo largo del ciclo de marea, pues se requeriría tomar un cierto volumen de muestra cada cierto tiempo, lo que desvirtuaría la relación superficie/volumen en los tanques del experimento conforme éste transcurriera. Por tanto, hubo que estimar el comportamiento del sistema del carbono inorgánico.

En todos los experimentos en régimen estacionario (SIES 1 a 18), se ha obtenido un comportamiento conservativo del carbono inorgánico (figura 3.2.). Asumiendo, por tanto, en SIES 20 un comportamiento similar del carbono inorgánico con la salinidad, y conociendo la evolución de la misma con el tiempo (se midió en continuo por medio de conductímetros), se puede estimar la variación de la concentración de carbono inorgánico con el tiempo en cada uno de los tanques del simulador.

Así, conociendo las variaciones temporales de salinidad, pH, temperatura y carbono inorgánico, y empleado las constantes de Mehrbarch et al. (1973), puede estimarse la especiación del carbono inorgánico a lo largo del tiempo en cada tanque del equipo. Los resultados se presentan en la figura 3.6.

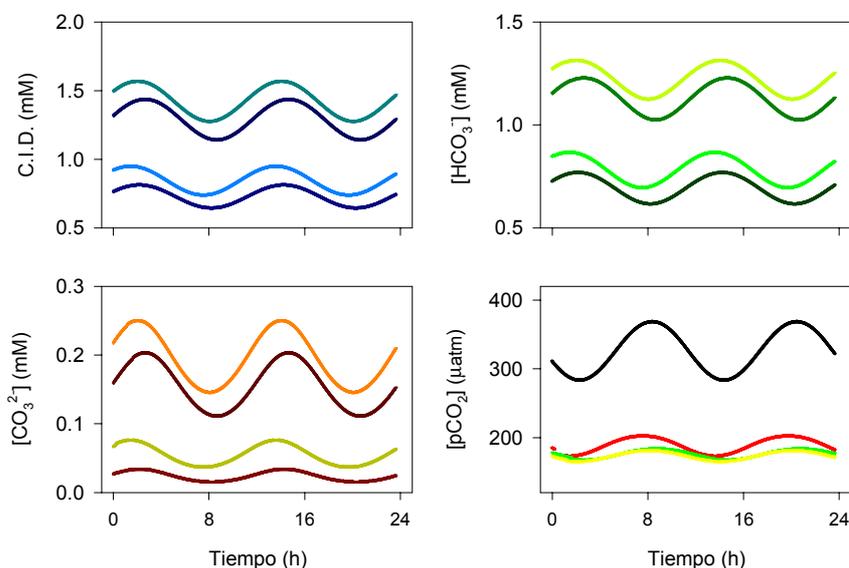


Figura 3.6. Especiación del sistema del carbono inorgánico (estimada) a lo largo de un ciclo mareal en el experimento SIES 20, el único realizado bajo dicho régimen.

A la vista de la figura, se deduce que las distintas especies del sistema del carbono inorgánico poseen una acusada dependencia con el carbono inorgánico disuelto (que ha sido estimado) y con el pH (medido en continuo en cada tanque mediante pH-ímetros). Y, como ambas variables varían de forma sinusoidal describiendo una variación de tipo semidiurno a lo largo de un ciclo de marea, el carbonato, el bicarbonato y la presión parcial de dióxido de carbono en el agua experimentan un comportamiento similar, ya que su cálculo se realiza a partir de los valores de pH y de carbono inorgánico.

3.3.2. Medida del flujo de CO₂ agua-atmósfera

Para determinar los flujos de gases a través de la interfase agua-atmósfera en el medio oceánico se han propuesto diversos modelos –dependiendo de la naturaleza de la interfase- que permiten la cuantificación de la velocidad de transferencia en función de la diferencia de concentración, o de presión parcial, del gas en ambos medios. En dichos modelos está implícito que la concentración del gas en ambas fases permanece constante al menos durante un período de tiempo del mismo orden de magnitud que la duración de las medidas. Esto se asume ya que, si bien la concentración de CO₂ tiene una marcada evolución circadiana en el mar (regida por la evolución de los procesos de fotosíntesis-respiración), en intervalos de pocas decenas de minutos puede considerarse constante en una primera aproximación. Además, cualquier aumento o disminución de la concentración del gas en el agua de mar o en la atmósfera, provocado por su transferencia de una fase a otra, queda difuminado por la acción de la difusión y la advección en dos medios, que pueden considerarse ilimitados en relación con la escala espacial en la que se realizan las mediciones.

Por el contrario, cuando se pretende determinar el flujo de CO₂ en ensayos de laboratorio usando un simulador como el que se describe en esta Memoria en el que los volúmenes de la fase acuosa y gaseosa de los tanques son reducidos, el propio flujo de gas a través de la interfase que separa ambos medios hace que se modifique a lo largo del tiempo de experimentación el gradiente de concentración entre ellos. Este artefacto hace que los flujos medidos en cualquier instante distinto del inicial en el que se pusieron en contacto el agua de mar y el aire den valores por defecto del flujo real.

De acuerdo con lo propuesto por Liss y Slater (1974) para gases como el CO₂, CH₄ y CO, que no tienen una elevada solubilidad, en este trabajo se ha considerado que la interfase es de naturaleza exclusivamente líquida; es decir, la resistencia al transporte de la capa límite gaseosa es despreciable con respecto a la que presenta la capa límite líquida (Whitman, 1923). En la figura 3.7. se indica gráficamente esta estructura de la interfase agua-aire en términos de la variación de la concentración o de la presión parcial del gas en el medio.

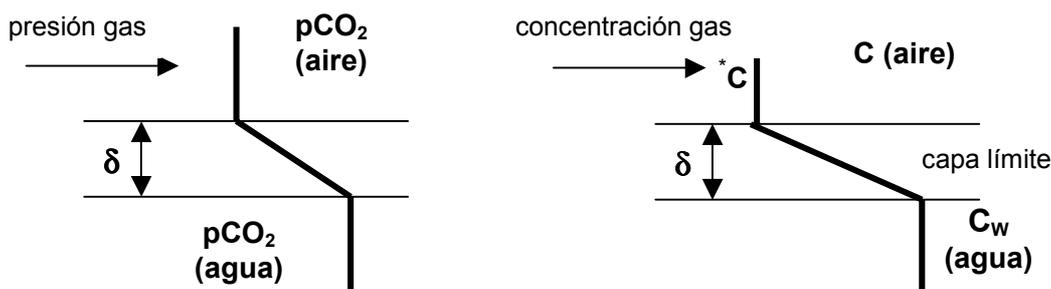


Figura 3.7. Perfil de presiones y de concentraciones de gas en la interfase

Asumiendo esta estructura de la interfase agua-atmósfera, de la Paz (2000) propuso un modelo para estimar los flujos de CO_2 a partir de la variación de su presión parcial en la atmósfera limitada de un microcosmos. Este modelo, basado en uno anterior (Forja y Gómez-Parra, 1998) desarrollado para la medida de la regeneración bentónica de nutrientes, consiste en considerar, junto con el proceso de transferencia de fase que se desea determinar, la alteración que supone en el mismo el dispositivo experimental utilizado para su medida. Este artefacto, que es necesario para la medida de los flujos, se produce, como se ha indicado, como consecuencia del aumento de la concentración de CO_2 en la fase gaseosa que simula a la atmósfera debido a su volumen limitado.

A continuación, se expone una adaptación del procedimiento propuesto por de La Paz (2000) para el cálculo de los flujos de CO_2 en los distintos tanques que constituyen el simulador de estuarios que, como en el modelo original, está basada en las siguientes hipótesis:

1º) El único mecanismo involucrado en el transporte del gas en el seno de la interfase, de espesor δ , es la difusión. Esto hace que el gradiente de concentración dentro de la capa límite estacionaria sea lineal. En estas condiciones, el paso de CO_2 a través de la interfase constituye la etapa limitante del proceso de transferencia entre el agua y el aire (o viceversa).

2º) La cantidad de carbono inorgánico contenida en el volumen de agua del tanque es lo suficientemente grande, en comparación con la que existe en la parte que simula a la atmósfera, como para admitir que cualquier variación de su concentración a consecuencia de los flujos de CO_2 a través de la interfase, en uno u otro sentido, es despreciable.

3º) No existe ninguna actividad biológica ni ningún proceso químico durante la experimentación que produzca variaciones en la concentración total de carbono inorgánico en el sistema.

Adicionalmente se supone que ambos medios –acuoso y gaseoso- están lo suficientemente agitados como para considerar que no existe ningún gradiente de concentración en su interior.

De esta manera, de la propia definición del flujo de materia y considerando que S es el área de la superficie de separación entre el agua y el aire y V el volumen de aire que contiene el tanque, puede relacionarse el flujo de gas a través de la interfase con la concentración de CO₂ (C) en la fase gaseosa

$$F = \frac{V}{S} \cdot \frac{dC}{dt} = \frac{1}{R} \cdot \frac{dC}{dt} \quad [1]$$

donde implícitamente se considera que el volumen de aire permanece constante durante la experimentación y R es el cociente entre el volumen de aire del tanque y el área de la superficie de separación entre las fases acuosa y gaseosa.

Ya que el transporte a través de la interfase es por difusión molecular, según la 1ª ley de Fick, se tiene que el flujo (F) viene dado por

$$F = D \frac{\partial C}{\partial z} = \frac{D}{\delta} (C_w - C^*) = K (C_w - C) \quad [2]$$

donde D es el coeficiente de difusión molecular del CO₂ en la interfase líquida, K es la velocidad de transferencia agua-aire, C_w (mol·L⁻¹) es la concentración de CO₂ en el agua, y C* (mol·L⁻¹) es la concentración del gas en la interfase que se encuentra en equilibrio con la atmósfera, la cual se puede relacionar con la presión parcial del gas en la atmósfera (pCO₂) mediante la solubilidad (α):

$$C^* = \alpha \cdot pCO_{2(\text{aire})} \quad [3]$$

Como se vio con anterioridad la dependencia de la solubilidad con la salinidad y la temperatura puede obtenerse a partir de la expresión de Weiss (1974)

$$\ln \alpha = A_1 + A_2(100/T) + A_3 \ln(T/100) + S [B_1 + B_2 (T/100) + B_3 (T/100)^2] \quad [4]$$

donde T es temperatura absoluta, S, la salinidad y A_i y B_i son constantes.

Para relacionar C y C^* , es decir la concentración de gas en la atmósfera con la concentración de gas en la interfase en equilibrio con la atmósfera, se utilizan la siguientes expresiones

$$p\text{CO}_2 = X_{\text{CO}_2} \cdot P_T \quad [5]$$

$$C^* = \alpha \cdot X_{\text{CO}_2} \cdot P_T \quad [6]$$

donde P_T es la presión total del sistema y X_{CO_2} ($\mu\text{mol/mol}$) es la fracción molar del gas en el aire, que son las unidades de concentración en que se expresan las medidas del equipo de análisis empleado (IRGA):

$$X = \frac{C \cdot P_M}{\rho_{\text{aire}} \cdot 10^{-3}} \quad [7]$$

donde P_M es el peso molecular del aire ($\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$) y ρ_{aire} es la densidad del aire ($\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$).

El valor de P_M depende de la presión total (P_T en KPa) y de la presión parcial de vapor de agua (e , en KPa), que son registradas de manera continua por el IRGA, de la siguiente manera

$$P_M = 29 \left(1 - \frac{e}{P_T} \right) + 18 \cdot \frac{e}{P_T} \quad [8]$$

Teniendo en cuenta la dependencia con P_T y T de la densidad del aire (DOE, 1994):

$$\rho_{\text{aire}} = \frac{[3.4848 \cdot (P_T - 0.3796 \cdot e)]}{T} \cdot 10^{-3} \quad [9]$$

Sustituyendo ambas en la expresión de C^* [6]:

$$C^* = \frac{\alpha \cdot P_M \cdot P_T}{\rho_{\text{aire}} \cdot 10^3} \cdot C \quad [10]$$

Esta última ecuación se puede simplificar llamando H a la siguiente expresión:

$$H = \frac{\alpha \cdot P_M P_T}{\rho_{\text{aire}} \cdot 10^{-3}} \quad [11]$$

Y, por tanto,:

$$C^* = H \cdot C \quad [12]$$

Ya que la medida que realiza el IRGA es la fracción molar del gas en el aire, el cálculo de los flujos debe expresarse en términos de X_{CO_2} . Para ello, diferenciando la expresión [7], se obtiene:

$$dC = \frac{\rho_{\text{aire}} \cdot 10^{-3}}{P_M} dX \quad [13]$$

Igualando las expresiones [1] y [2] y sustituyendo en ellas dC por su equivalente en dX se obtiene:

$$F = \frac{1}{R} \cdot \frac{\rho \cdot 10^{-3}}{P_M} \frac{dX}{dt} = K (C_w - \alpha P_T X) \quad [14]$$

Despejando términos se llega a la expresión:

$$\frac{dX}{dt} = RHK \left(\frac{C_w}{\alpha \cdot P_T} - X \right) \quad [15]$$

Integrando esta ecuación se obtiene la variación de la fracción molar de CO_2 en el aire con el tiempo. Para ello se considera que H permanece constante en el tiempo, y que también lo hacen la concentración del gas en el agua (C_w), temperatura, salinidad, presión total (P_T) y vapor de agua (e):

$$X = \frac{C_w}{\alpha \cdot P_T} - \left(\frac{C_w}{\alpha \cdot P_T} - X_0 \right) \cdot e^{-RHK t} \quad [16]$$

Expresión que cumple las condiciones límite, ya que para $t=0 \rightarrow X=X_0 = y_0$ y para $t = \infty \rightarrow X = C_w / \alpha P_T$

Esta expresión se ajusta a una función exponencial de tres parámetros reducida a la forma:

$$X = y_0 + a \cdot (1 - e^{-bt}) \quad [17]$$

donde:

$$y_0 + a = \frac{C_w}{\alpha P_T} \quad ; \quad a = \frac{C_w}{\alpha P_T} - X_0 \quad ; \quad b = RHK \quad [18]$$

Los valores de y_0 , a y b pueden obtenerse a partir del ajuste de los valores experimentales de X y t . El parámetro “ y_0 ” se puede identificar como la fracción molar de CO_2 inicial en el aire que, como se indicó con anterioridad, debe estar en torno a 350 ppm. Por otra parte, el valor de “ y_0+a ” permite calcular la concentración de CO_2 en el agua a partir de las variaciones de la concentración en la atmósfera. Los valores obtenidos mediante este cálculo son próximos a los valores experimentales en el agua.

Finalmente, el flujo de CO_2 viene dado por:

$$F = \frac{1}{R} \frac{\rho_{\text{aire}}}{P_M} 10^{-3} \cdot \frac{dX}{dt} = K \cdot (C_w - \alpha P_T X_0) \cdot e^{-RHKt} \quad [19]$$

donde X_0 es la concentración de CO_2 ($\mu\text{mol/mol}$) inicial en el aire. Según esta expresión, el flujo de CO_2 aire-agua decrecería exponencialmente con el tiempo, ya que disminuye el gradiente del gas a ambos lados de la interfase.

Para cuantificar el proceso de transferencia de CO_2 a través de la interfase sin que el propio dispositivo experimental interfiera, debe establecerse el flujo en el instante inicial, en el que todavía no se ha producido ninguna alteración en el sistema. Así, para $t=0$ resulta:

$$F|_{t=0} = K \cdot (C_w - \alpha P_T X_0) \quad [20]$$

La constatación de la validez del modelo empleado para el cálculo de los flujos aire-agua puede comprobarse a partir de los registros temporales de CO_2 ($\mu\text{mol/mol}$) medidos por el IRGA, y del cálculo a partir de éstos de las presiones parciales y de los flujos.

En la figura 3.8. se muestra la variación de la $p\text{CO}_2$ obtenida en una de las mediciones realizadas en la fase gaseosa de uno de los tanques del simulador. Como ha sido la práctica habitual, con anterioridad al registro de la variación de la $p\text{CO}_2$, la concentración de dicho gas en la atmósfera de ese tanque se redujo hasta un valor próximo a $350 \mu\text{mol/mol}$, por medio de la inyección de aire sintético. Puede observarse que existe una gran concordancia con la evolución de la concentración prevista por la ecuación [16] del modelo presentado.

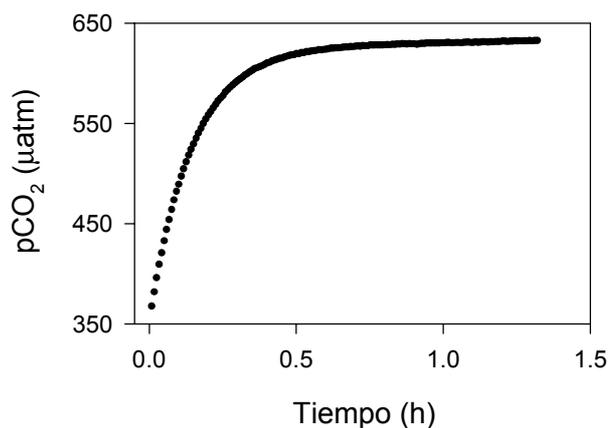


Figura 3.8. Variación de la presión parcial de CO_2 con el tiempo en un tanque del simulador en uno de los ensayos realizados.

Esta concordancia con el modelo propuesto se aprecia también en la evolución de los flujos de CO_2 a través de la interfase agua-atmósfera prevista por la expresión [19] y los resultados experimentales obtenidos en uno de los ensayos realizados (Ver, a modo de ejemplo, la figura 3.9.)

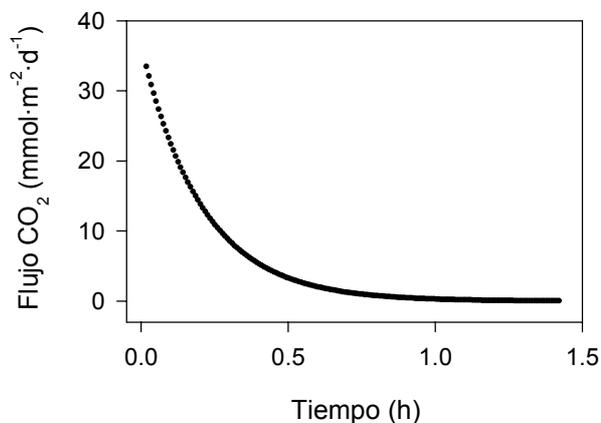


Figura 3.9. Variación del flujo de CO_2 agua-atmósfera frente al tiempo en un tanque del simulador en uno de los experimentos realizados

En los distintos experimentos anteriormente reseñados (desde SIES 6 hasta SIES 12), una vez alcanzado el estado estacionario en el gradiente de salinidad o pH deseado, cada tanque se sometió a un período de medida con el IRGA de aproximadamente dos horas, durante el cual la $p\text{CO}_2$ varió de la forma ya indicada. En la figura 3.10. se presentan, a modo de ejemplo, algunos registros de la variación de la $p\text{CO}_2$ en la atmósfera frente al tiempo en los diferentes tanques del equipo durante el período de incubación con el IRGA en uno de los experimentos realizados.

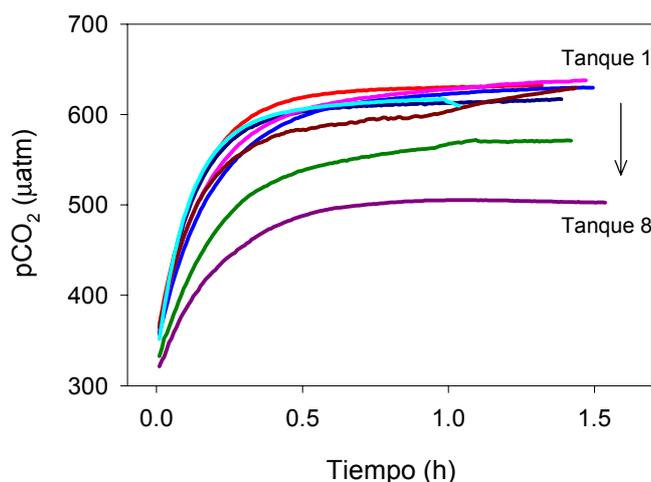


Figura 3.10. Variación de la $p\text{CO}_2$ frente al tiempo en los ocho tanques del simulador en la incubación realizada con el IRGA durante el desarrollo del experimento SIES 6.

En la figura se observa cómo, en todos los tanques, la tendencia es la misma. Conforme transcurre el tiempo de incubación, las concentraciones de $p\text{CO}_2$ en la fase gaseosa aumentan de forma asintótica con respecto del valor de la $p\text{CO}_2$ del agua que circula por cada tanque.

A veces, el flujo se invierte y en estos casos la curva ($p\text{CO}_2$ vs t) adopta la tendencia contraria. Puntualmente, esta situación se presentó en alguno de los tanques en los ensayos que se describen.

En los distintos ensayos, las curvas que muestran la variación de $p\text{CO}_2$ en el aire frente al tiempo se ajustan a una función exponencial creciente como la que se propone en el modelo descrito en este mismo apartado [$X_{\text{CO}_2} = y_0 + a(1 - e^{-bt})$].

Todo lo anterior viene a verificar la consistencia del modelo empleado para el cálculo de flujos de CO_2 agua-atmósfera. No sólo las curvas son como predice dicho modelo (figura 3.10.), como ya se ha señalado, sino que el valor de ordenada de la asíntota depende de la $p\text{CO}_2$ en cada tanque.

Por otra parte, la adecuación del modelo postulado para el cálculo de los flujos aire-agua está supeditada al grado de validez que tengan las suposiciones en las que se basa. La constancia relativa de los valores de presión parcial de H₂O, temperatura y presión total, se muestra en la figura 3.11. en la que se presentan algunos ejemplos de los registros temporales de la presión parcial de vapor de agua, la temperatura y la presión total (presión atmosférica). En todos los casos los registros oscilaron en torno a un valor medio durante toda el período de medida, presentando unas desviaciones estándar despreciables.

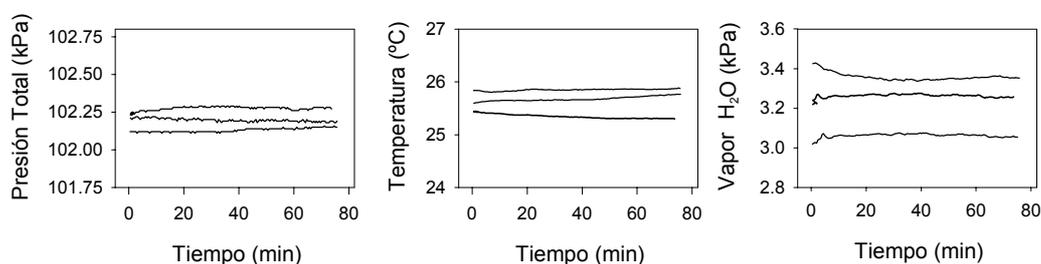


Figura 3.11. Registros temporales de presión total, temperatura y presión parcial de vapor de agua en tres incubaciones del IRGA tomadas al azar entre todas las efectuadas.

3.3.3. Flujos de CO₂ agua-atmósfera

a) Régimen estacionario

Flujos de CO₂ agua-atmósfera con el gradiente de salinidad

De acuerdo con la ecuación [19] del apartado 3.3.2. de este mismo capítulo, los flujos se han calculado a partir del producto de la derivada de la concentración de CO₂ en aire con respecto al tiempo por el inverso de la relación superficie-volumen (“superficie” de contacto entre ambas fases y “volumen” de la fase aérea). Dicho flujo está provocado por la diferencia de presiones parciales de CO₂ entre aire y agua. De ahí que, conforme aumenta la concentración de CO₂ en la atmósfera (tendiendo al equilibrio), y suponiendo que la concentración en agua permanece prácticamente constante debido a la interconversión de especies del sistema del carbono inorgánico en el agua, el gradiente

de presiones irá disminuyendo desde el instante en que se sellaron los tanques y, con ello, el flujo.

En lo que respecta a los flujos, conviene hacer una doble distinción, ya que se han obtenido dos grupos distintos de datos:

- De un lado, se han obtenido curvas de flujo de CO₂ atmosférico frente al tiempo (es decir, desde presiones en la atmósfera próximas a 350 μatm, hasta que se alcanza el equilibrio entre las presiones parciales en agua y aire). Estas curvas serían la representación del flujo en un tanque concreto frente al tiempo a lo largo de una incubación (en torno a dos horas, que es el período de medida con el IRGA en dicho tanque).

- De otro, se han representado curvas de flujo a una concentración fija de CO₂ en el aire frente a un gradiente de salinidad (o pH, según el experimento). El gradiente de pCO₂ en la interfase agua-atmósfera se ha obtenido como diferencia del valor en cada muestra de agua superficial y el valor promedio mundial actual de la pCO₂ atmosférica, 365 μatm (Frankignoulle y Borges, 2001). Otros autores también han realizado aproximaciones de este tipo (Frankignoulle et al., 1998; Borges y Frankignoulle, 1999; Abril et al., 2000; Raymond et al., 2000). Este segundo grupo de gráficas representaría un valor de flujo de CO₂ para cada tanque (considerando la pCO₂ en el aire fija en 365 μatm) a lo largo del gradiente de salinidad (o pH) de cada experimento.

1. En lo que respecta a la representación de los flujos de CO₂ frente al tiempo, se puede ver cómo los resultados se ajustan a una función exponencial decreciente del tipo “flujo_{CO2} = y₀ + a · e^{-t/x}”; (figura 3.12.a.). Este resultado es el esperado debido a que, como se ha visto anteriormente, el gradiente de presiones aire-agua va disminuyendo con el tiempo al ir alcanzándose el equilibrio. Al final, el flujo se hace cero cuando se alcanza dicho equilibrio tras la incubación. No obstante, existen excepciones en algunos tanques de ciertos experimentos en los que los flujos de CO₂ se invierten, por lo que las curvas adoptan justo la tendencia contraria frente al tiempo (figura 3.12.b.). En estos casos, lo que sucede es que la pCO₂ inicial en el aire es inferior incluso a 350 μatm y la fase acuosa del tanque, en lugar de actuar como una fuente de CO₂ a la atmósfera, se comporta como un sumidero.

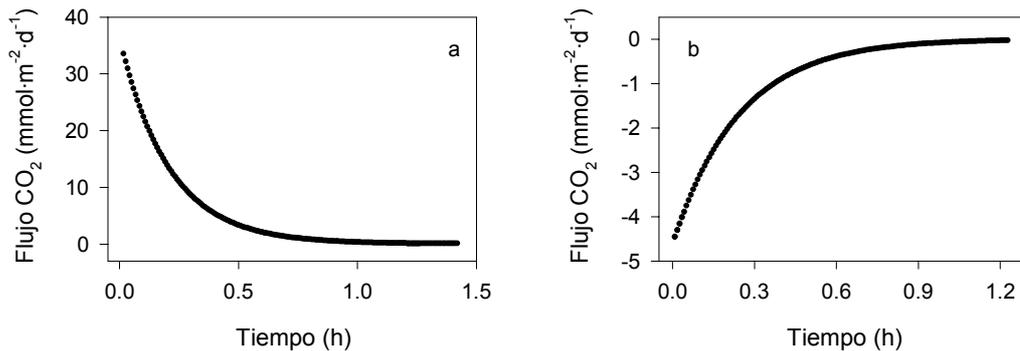


Figura 3.12. a) Variación del flujo de CO₂ agua-atmósfera a lo largo del tiempo calculado en un tanque del simulador en uno de los ensayos realizados. b) Flujo negativo de CO₂ agua-atmósfera frente al tiempo calculado en un tanque del simulador en uno de los ensayos realizados.

2. En lo que respecta a la variación de los flujos de CO₂ frente a salinidad a lo largo del estuario, se observa cómo en los cuatro primeros experimentos realizados (SIES 6, 7, 8 y 9) la tendencia es similar: las curvas describen una función exponencial decreciente; es decir, en todos los casos, el flujo de CO₂ disminuye de forma exponencial a medida que la salinidad aumenta (figura 3.13).

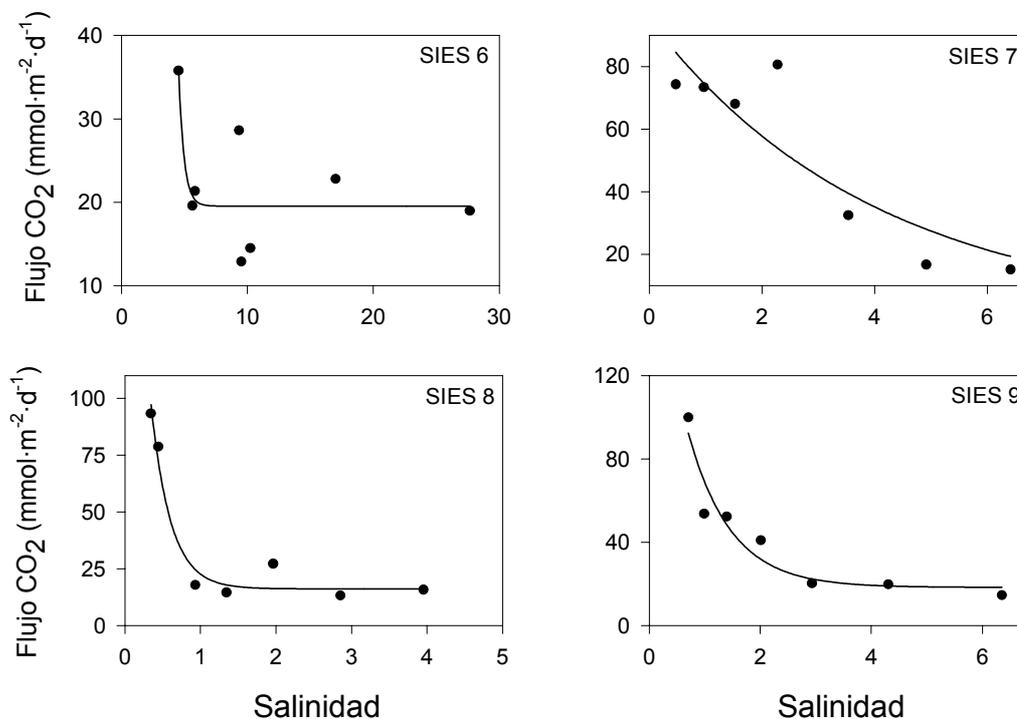


Figura 3.13. Flujos de CO₂ agua-atmósfera en los cuatro únicos experimentos en los que se generaron gradientes de salinidad (SIES 6 a 9).

La figura 3.13. muestra los valores de los flujos aire-agua frente a la salinidad en los distintos experimentos. Este comportamiento se ha observado en diferentes estuarios europeos (Elbe, Ems, Rin, Scheldt, Tamar, Támesis, Gironde, Duero, Sado) por distintos autores (Kempe, 1984; Kempe et al., 1991; Frankignoulle et al. 1998; Abril et al., 2000, respectivamente). De cualquier forma, la relación entre flujo de CO_2 y salinidad no es directa. Un gradiente de salinidad generalmente implica, a su vez, un gradiente de pH. Conforme los tanques poseen mayores valores de salinidad, también su pH es mayor, que es lo que justifica la relación inversa entre flujo de CO_2 y salinidad. Por otro lado, para los experimentos SIES 7, 8 y 9, los valores del flujo inicial y final en los tres casos son muy parecidos (100 y $12 \text{ mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{día}^{-1}$, respectivamente), lo cual era previsible ya que las condiciones de experimentación fueron similares en los tres ensayos.

De cualquier forma, queda claro cómo, en todos los casos, los flujos más elevados se producen en la zona más “fluvial” del estuario tal y como se describe en los estuarios reales.

A modo de ejemplo, en la figura 3.14. se presenta una gráfica con los valores de pCO_2 (en agua) y de los flujos aire-agua correspondientes, frente a la salinidad en uno de los experimentos (SIES 7). En dicha gráfica se observa cómo el comportamiento de ambas variables frente a la salinidad es similar.

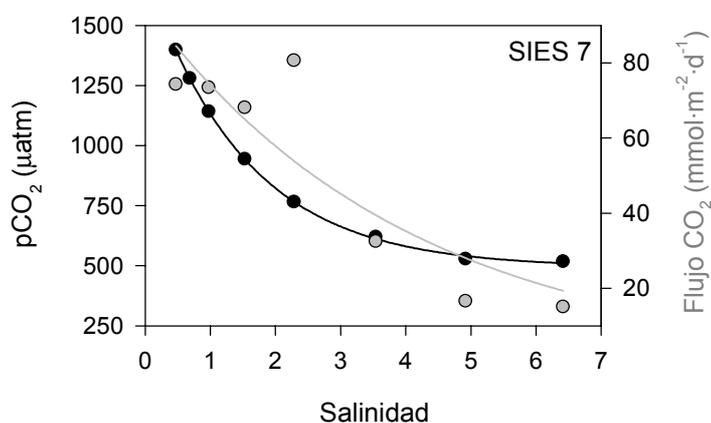


Figura 3.14. Valores de pCO_2 en agua (●) y de flujos de CO_2 agua-atmósfera (○) correspondientes frente a la salinidad en SIES 7.

Por otro lado, se presenta también a modo de ejemplo en la figura 3.15. una gráfica con valores de flujo de CO_2 y oxígeno disuelto frente a la salinidad en uno de los experimentos realizados (SIES 7). Como señalan varios estudios, existe una correlación

apreciable entre flujo de CO₂ y oxígeno disuelto (DeGrandpre et al., 1996 y 1997; Boehme et al., 1998; Abril et al., 2000). Existen una serie de procesos que pueden causar tal correlación y están relacionados con una mayor tasa de intercambio de oxígeno agua-atmósfera en comparación con la que experimenta el CO₂, la dependencia de la solubilidad del oxígeno y del sistema del carbono inorgánico con la temperatura y ciertos procesos biológicos (Boehme et al., 1998).

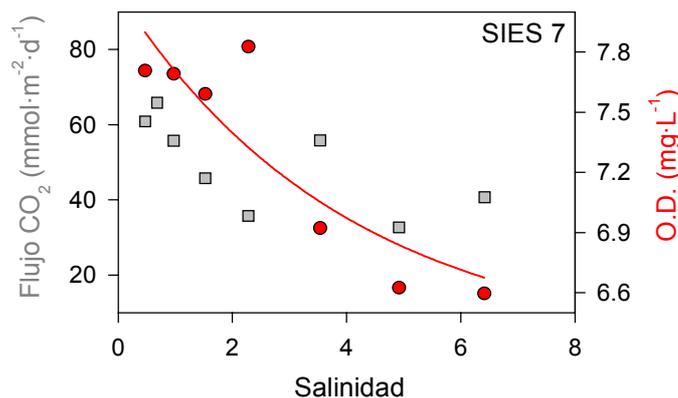


Figura 3.15. Valores de flujo de CO₂ agua-atmósfera (□) y oxígeno disuelto (●) frente a la salinidad en uno de los experimentos realizados (SIES 7).

Flujos de CO₂ agua-atmósfera con el gradiente de pH

Los resultados de los flujos de CO₂ obtenidos en los tres experimentos en los que se ha simulado un gradiente de pH (SIES 10, 11 y 12) se muestran en la figura 3.16.

En dicha figura se observan dos cosas:

1. Una disminución del flujo de CO₂ con el aumento del pH (como se ha comentado anteriormente) en cada experimento.
2. Los valores de flujo disminuyen comparativamente entre los tres experimentos a medida que la salinidad de trabajo de cada experimento aumenta. De ahí que los flujos más altos se alcancen en SIES 11 (~80 mmol·m⁻²·día⁻¹), donde la salinidad de trabajo es la menor (4.94) y los flujos más bajos se registren en SIES 12 (~20 mmol·m⁻²·día⁻¹), donde la salinidad de trabajo fue la más elevada (38.21). Este hecho está asociado a la relación existente entre salinidad y pH y la de éste con el flujo de CO₂.

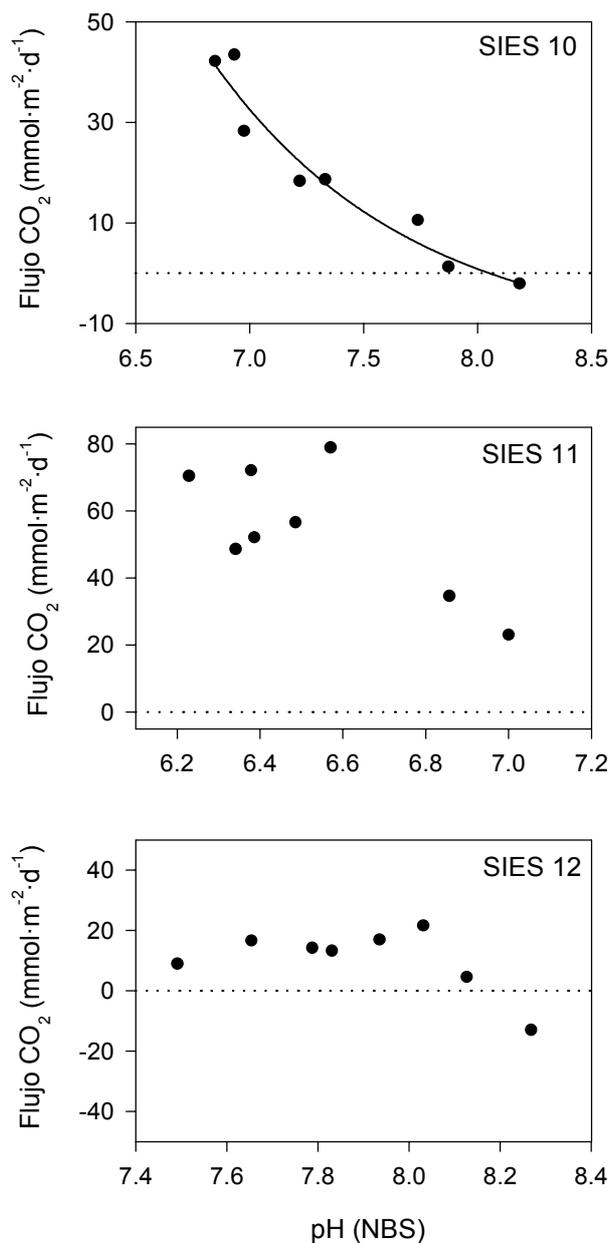


Figura 3.16. Flujos de CO₂ agua-atmósfera a lo largo del gradiente de pH establecido a salinidad constante en los ensayos SIES 10 (S=19), SIES 11 (S=5) y SIES 12 (S=38).

Dentro de cada uno de estos tres experimentos, lo único que varió de un tanque a otro fue el pH. A medida que aumentó el mismo, menores fueron las concentraciones de CO₂ disuelto en el agua, menores los flujos aire-agua y menor también la concentración del gas para $t=\infty$ alcanzada en la atmósfera. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos similares (Kempe et al., 1991, De la Paz, 2000).

En dos de estos experimentos, además, se produce una situación especial: la inversión de los flujos de CO₂. En el tanque 7, tanto en SIES 10 como en SIES 12 (los dos experimentos con la salinidad de trabajo más elevada), el flujo se invierte (adquiriendo valores negativos) actuando la fase acuosa de dicho tanque como sumidero de CO₂. En la figura 3.16. se observa cómo dichas inversiones se producen, en ambos casos, a un valor de pH en torno a 8.2, lo que hace suponer que a partir de esos valores podría producirse la inversión del flujo de CO₂.

b) Régimen mareal

Para la cuantificación de los flujos de CO₂ agua-atmósfera en un estuario verticalmente homogéneo y sometido a régimen mareal se ha procedido de idéntica manera que en las mediciones en régimen estacionario, con una salvedad: en lugar de medir en cada tanque con el IRGA durante un único período de tiempo (dos horas), se repitió la medida en cada tanque, durante períodos de tiempo de 35 minutos, a lo largo de un ciclo de marea (12 horas; 21 determinaciones por cada tanque).

Ello se debe a que, en régimen mareal, las variables quimicofísicas varían con el tiempo de forma cíclica, por lo que los flujos de CO₂ *a priori* también lo harán. De ahí que sea necesario un seguimiento temporal de los mismos, al menos durante un ciclo de marea, ya que al terminar éste el comportamiento se repite cíclicamente. Al comienzo de cada una de las mediciones, la concentración de CO₂ en el aire se redujo mediante inyección de aire sintético. Por lo tanto, dicha concentración siempre tiende a crecer a fin de alcanzar una situación de equilibrio entre presiones parciales en aire y agua. Al igual que en estado estacionario, las curvas de pCO₂ (en aire) frente a tiempo registradas cada 35 minutos describen una función exponencial creciente que puede ajustarse a una expresión del tipo $X_{\text{CO}_2(\text{aire})} = y_0 + a(1 - e^{-bt})$, obteniéndose, en todos los casos, unos coeficientes de regresión excelentes.

En la figura 3.17.a) y b) se presenta la evolución de la salinidad y del pH con el tiempo a lo largo de 24 horas en los distintos tanques utilizados en SIES 20.

Se observa cómo, en todo los casos, la salinidad describe una función senoidal del tipo $S_x = S_x(t) = M_x + A_x \cdot \text{sen}(\omega \cdot t + \phi_x)$, donde M_x es el promedio de salinidad en un tramo del estuario situado en la posición “x” de su eje longitudinal, $2A_x$ es la diferencia máxima de salinidad en “x”, ω es la frecuencia de la onda de marea ($\omega = 2\pi/\text{período}$) y ϕ_x indica el

desfase de la pleamar en el lugar “x” con respecto al instante en que se produce en la desembocadura. La expresión que describe la salinidad experimentalmente concuerda con lo que se pretendía simular *a priori* (Capítulo 2). En la Tabla 3.2, se presentan los valores de los ajustes de las expresiones para la salinidad en cada tanque.

Tabla 3.2. Parámetros de ajuste de las expresiones de la salinidad en función del tiempo [$S=M_x+A\cdot\text{sen}(\omega t+\phi)$] para cada uno de los tanques empleados en el experimento SIES 20.

	Tanque 1	Tanque 2	Tanque 3	Tanque 4
M_x	7.6980	10.634	22.075	25.4826
A_x	2.1437	2.6765	3.7647	3.7261
período	12.08	12.16	12.00	12.03
$\phi(x)$	6.7219	0.8181	6.4704	0.5133
r^2	0.9969	0.9939	0.9861	0.9929

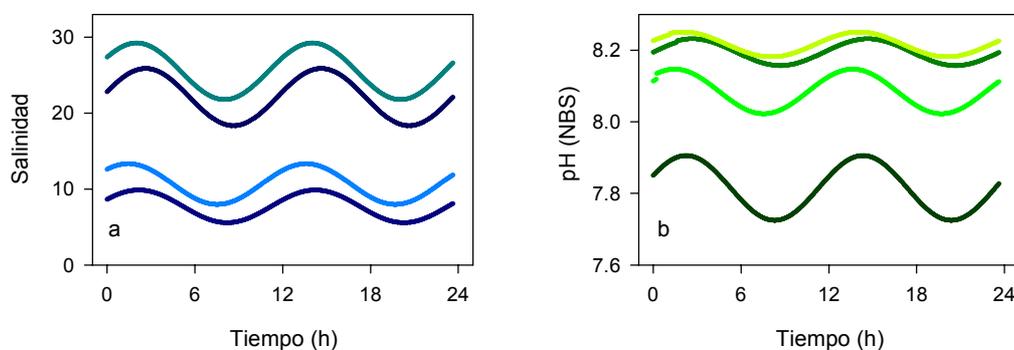


Figura 3.17. a) Evolución de la salinidad frente al tiempo a lo largo de un ciclo de marea en los tanques integrantes del equipo en el ensayo SIES 20. b) Evolución del pH frente al tiempo a lo largo de un ciclo de marea en los tanques integrantes del equipo en el ensayo SIES 20.

Se observa cómo, en todo los casos, el pH también describe una función de tipo senoidal. En la Tabla 3.3., se presentan los valores de los ajustes de las expresiones para el pH en cada tanque.

Tabla 3.3. Parámetros de ajuste de las expresiones del pH en función del tiempo [pH= $y_0+a\cdot\text{sen}(\omega t+\phi)$] para cada uno de los tanques empleados en el experimento SIES 20

	Tanque 1	Tanque 2	Tanque 3	Tanque 4
y_0	7.8148	8.0841	8.1937	8.2155
a	0.0904	0.0621	0.0374	0.0347
período	12.08	12.16	12.00	12.03
$\phi(x)$	6.6752	0.9352	7.3112	1.1103
r^2	0.9166	0.6409	0.8388	0.7823

En la figura 3.18. se presenta el incremento de salinidad experimentado en cada uno de los tanques de SIES 20 a lo largo de un ciclo de marea completo. Se observa cómo la curva descrita concuerda con la esperable desde un punto de vista teórico para los incrementos de salinidad en cada uno de los tanques. La salinidad media crece desde el tanque 1 al tanque 4, lo que quiere decir que éste último representaría el tramo más marino del estuario. Y es, precisamente en esta zona, donde las variaciones de salinidad son más acusadas, como sucede en la realidad. A partir de este tramo y, conforme los tanques representan tramos más fluviales del estuario, el incremento de salinidad es cada vez menos acusado, debido a que el efecto de la marea sobre la salinidad se va atenuando aguas arriba.

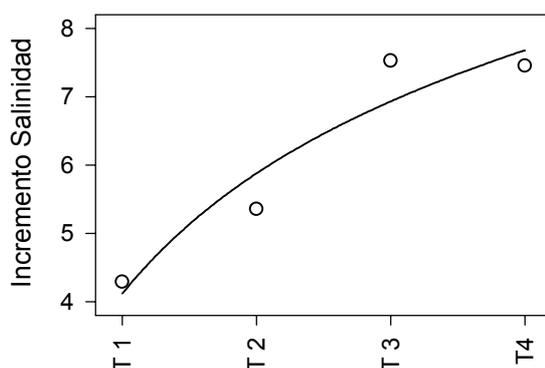


Figura 3.18. Incremento de salinidad experimentado en cada uno de los tanques empleados en el ensayo SIES 20 tras un ciclo de marea.

En la figura 3.19. se presentan las variaciones con el tiempo de la salinidad y del flujo de CO₂ agua-atmósfera en cada uno de los tanques de SIES 20.

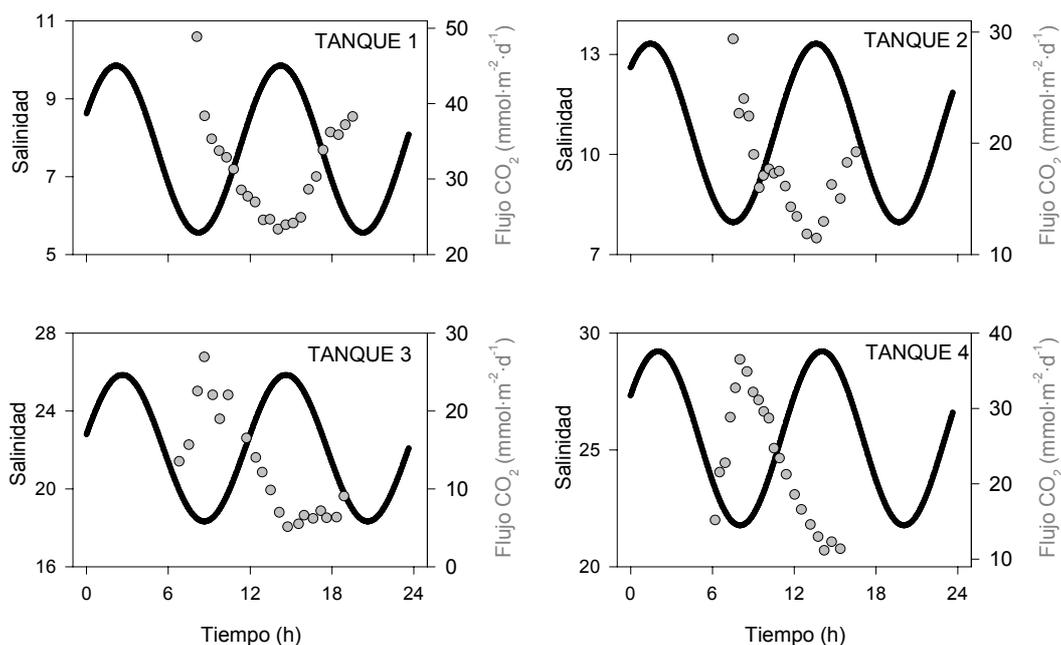


Figura 3.19. Variación temporal de la salinidad (en trazo continuo) y de los flujos de CO₂ agua-atmósfera (○) a lo largo de 24 h de experimentación en cada uno de los tanques empleados en el ensayo SIES 20.

Se ha empleado la misma expresión que en el caso de estado estacionario para determinar el flujo de CO₂ agua-atmósfera a lo largo del tiempo en los distintos tanques del equipo y se observa cómo efectivamente estos flujos varían con el tiempo (figura 3.19.). Además, cada uno de los flujos varía de manera cíclica, describiendo una ecuación sinusoidal de expresión similar a la de la variación temporal de la salinidad. Por tanto, existirá una dependencia del flujo de CO₂ con la entrada y salida de agua de mar en el estuario (es decir, con la creciente y la vaciante). Además, como se observa en la figura 3.19., en todos los casos, los valores máximos de flujo coinciden con los mínimos de salinidad y viceversa. Esto es lógico si se tiene en cuenta que los valores mínimos de salinidad se corresponden con el instante de bajamar, y en dicha situación la influencia marina es mínima en el estuario; en este momento los valores de pH son los más bajos, produciéndose, como consecuencia, los mayores flujos de CO₂ agua-atmósfera. En la situación de máximo de salinidad (coincidente con el instante de pleamar) ocurre justo lo contrario. Borges y Frankignoulle (1999) encontraron este mismo comportamiento del CO₂ en la costa próxima a la desembocadura del estuario del Scheldt. Concretamente, las variaciones diarias de flujo de CO₂ que encontraron en dicha zona estaban relacionadas con dos fenómenos: el ciclo mareal y la actividad biológica. En el caso de SIES 20, la actividad biológica queda descartada debido al propio diseño del

experimento, por lo que las variaciones temporales de flujo en el estuario sólo están relacionadas con el ciclo mareal. Esta hipótesis parece acertada a tenor de la correspondencia entre salinidad y flujo que se observa en la figura 3.19.

Observando en la figura 3.19. los flujos máximos y mínimos de CO₂ tanque a tanque, puede verse cómo dichos valores van disminuyendo conforme la salinidad media del tanque aumenta. Dicha tendencia se atenúa en el tanque de salinidad media más próxima a la del agua de mar. Lógicamente el flujo va disminuyendo por efecto del aumento de la salinidad.

En las figuras 3.20 y 3.21. se presenta la evolución de los flujos de CO₂ frente a salinidad y frente a pCO₂ tanque a tanque, respectivamente. En la figura 3.20., se observa que existe una relación inversa entre flujo de CO₂ y salinidad. Dicha relación no es inmediata: un gradiente de salinidad generalmente implica, a su vez, un gradiente de pH. Conforme los tanques poseen mayores valores de salinidad, también su pH es mayor, que es lo que justifica la relación inversa entre flujo de CO₂ y salinidad. Por tanto, la figura 3.20., confirma una relación razonable entre flujo de CO₂ y salinidad.

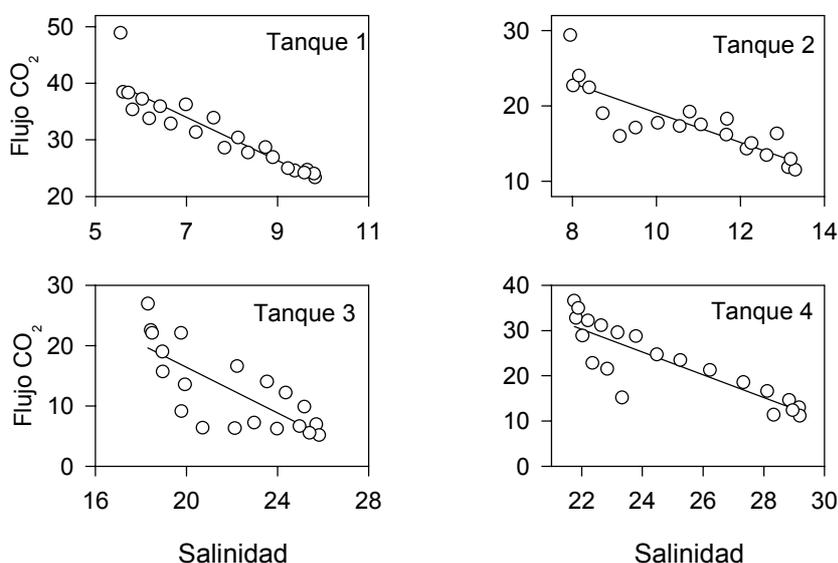


Figura 3.20. Flujos de CO₂ agua-atmósfera (mmol·m⁻²·d⁻¹) frente a la salinidad en cada uno de los tanques empleados en SIES 20.

Por contra, la relación entre flujo de CO₂ y pCO₂ en el agua es directa, como se presenta en la figura 3.21., lo cual es razonable, ya que, de la propia expresión de la obtención del flujo de CO₂ (Liss y Merlivat, 1986) se desprende que debe existir tal relación directa que

se confirma al representar los datos experimentales de $p\text{CO}_2$ en el agua frente a los de flujo de CO_2 .

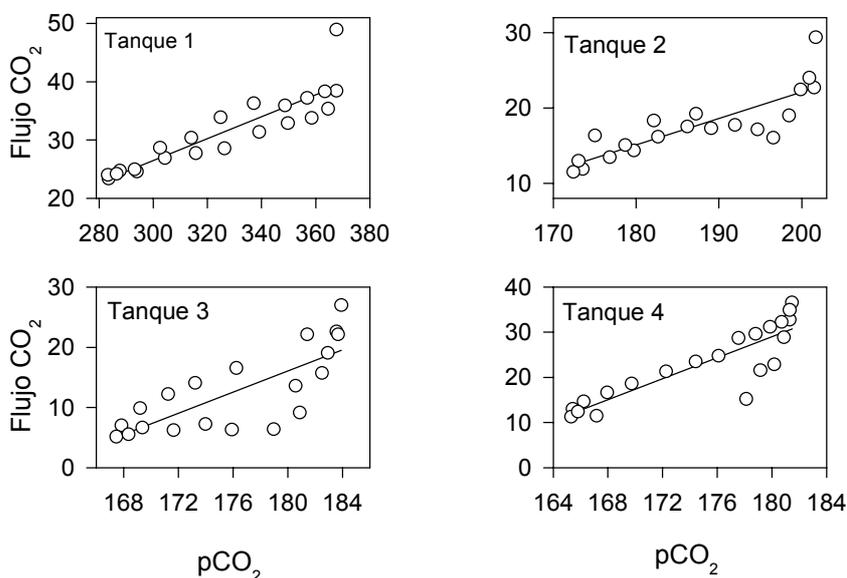


Figura 3.21. Flujos de CO_2 agua-atmósfera ($\text{mmol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$) frente a la $p\text{CO}_2$ (μatm) en el agua en cada uno de los tanques empleados en SIES 20.

c) Cálculo de los coeficientes de transferencia.

El cálculo de los coeficientes de transferencia se lleva a cabo a partir de los datos de flujos de CO_2 a tiempo cero medidos y de la diferencia de concentraciones entre ambas fases:

$$F = k \cdot (C_w - \alpha \cdot p\text{CO}_{2(\text{aire})}) \quad [1]$$

donde F es el flujo a través de la interfase, C_w es la concentración de CO_2 en el agua, α es la solubilidad, $p\text{CO}_2$ es la presión parcial de CO_2 en el aire y k es el coeficiente de transferencia del proceso de difusión en la interfase, que se puede definir como:

$$k = \frac{D}{\delta} \quad [2]$$

siendo D el coeficiente de difusión y δ el espesor de la interfase. A partir de los valores de k , y usando un coeficiente de difusión para el CO_2 a 25°C de $1.86 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2\cdot\text{s}^{-1}$ (Broecker y Peng, 1974), se puede calcular el espesor de la interfase.

En la figura 3.22. se presentan los distintos valores de los coeficientes de transferencia a lo largo del gradiente de salinidad (o pH) en los experimentos desarrollados, calculados de acuerdo con la ecuación [1].

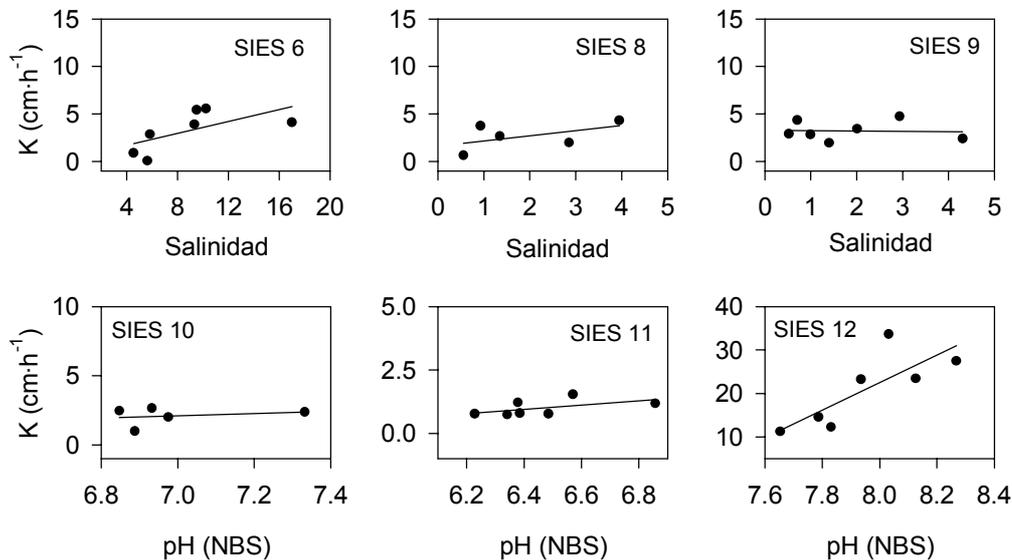


Figura 3.22. Coeficientes de transferencia calculados frente a la salinidad (en los ensayos SIES 6, 8 y 9) y frente al pH (en los ensayos SIES 10, 11 y 12).

En dicha figura se aprecia cómo los valores de los coeficientes de transferencia en los distintos ensayos oscilan dentro del mismo orden de magnitud, presentando además un comportamiento similar: lineal y con una ligera tendencia a crecer con la salinidad o el pH.

En trabajos anteriores, en los que se han obtenido valores de coeficientes de transferencia para distintas velocidades de viento (e.g. De la Paz, 2000), se observa que, a bajas velocidades de viento ($< 2 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$), existe una dependencia lineal entre el valor del coeficiente de transferencia y el pH y que sin embargo esta tendencia no se aprecia para velocidades de viento mayores que $3 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$, en las que no parece existir ninguna relación entre k y pH. En el trabajo descrito en esta Memoria, se trabajó siempre en condiciones de velocidad de viento cero, de ahí que los valores de los coeficientes de transferencia frente a pH guarden una relación lineal como la descrita en trabajos anteriores (ver figura 3.22.).

Por otra parte, una vez que se calcularon los coeficientes de transferencia, y mediante el uso de la ecuación [2], también se han calculado los espesores de la interfase para los

distintos tanques en todos los experimentos realizados en régimen estacionario. Los resultados se presentan en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4. Valor del espesor de la interfase agua-atmósfera (indicado siempre en mm) para cada uno de los tanques del equipo en todos los experimentos en régimen estacionario. También se presenta el valor medio para cada experimento.

	SIES 6	SIES 7	SIES 8	SIES 9	SIES 10	SIES 11	SIES 12
Tanque 1	0.763	0.030	0.275	0.233	0.272	0.888	0.037
Tanque 2	0.312	0.021	0.349	0.155	0.253	0.549	0.059
Tanque 3	0.234	0.012	0.403	0.239	0.333	0.901	0.046
Tanque 4	0.171	0.011	0.180	0.344	0.686	0.853	0.055
Tanque 5	0.124	0.032	0.252	0.195	0.283	0.887	0.029
Tanque 6	0.121	0.057	0.198	0.142	0.312	0.438	0.020
Tanque 7	0.164	0.844	0.338	0.284	0.386	0.568	0.029
Tanque 8	0.122	0.107	0.156	0.157	0.255	0.726	0.024
Valor medio	0.251	0.139	0.269	0.219	0.348	0.726	0.037

El intervalo de variación encontrado para el espesor de la interfase en los experimentos desarrollados está en concordancia con los espesores determinados en algunos estudios de campo o de laboratorio (Broecker y Peng, 1974; Smith, 1985; De la Paz, 2000).

3.4. BIBLIOGRAFÍA

Abril, G., Etcheber, H., Borges, A.V., Frankignoulle, M. 2000. Excess atmospheric carbon dioxide transported by rivers into the Scheldt estuary. *Earth Planet. Sc. Lett.*, 330: 761-768.

Benoit, G., Otkay-Marshall, A., Cantu, A., Hood, E.M., Coleman, C.H., Corapcioglu, M.O., Santschi, P.H. 1994. Partitioning of Cu, Pb, Ag, Zn, Fe, Al y Mn between filter-retained particles, colloids, and solution in six Texas estuaries. *Mar Chem*, 45: 307-336.

Boehme, S.E., Sabine, C.L., Reimers, C.E. 1998. CO₂ fluxes from a coastal transect: a time-series approach. *Mar. Chem.*, 63: 49-67.

Borges, A.V., Frankignoulle, M. 1999. Daily and seasonal variations of the partial pressure of CO₂ in surface seawater along Belgian and Dutch coastal areas. *J. Mar. Sys.*, 19: 251-266.

Broecker, W.S., Peng, T.H. 1974. Gas exchange rates between air and sea. *Tellus*, 26: 21-35.

Cai, W.J., Wang, Y. 1998. The chemistry, fluxes and sources of carbon dioxide in the estuarine waters of the Satilla and Altamaha rivers, Georgia. *Limnol. Oceanogr.*, 43: 657-668.

De La Paz, M. 2000. Dependencia del coeficiente de transferencia del CO₂ a través de la interfase océano-atmósfera con la velocidad del viento y el pH en ensayos de simulación en microcosmos. Tesis de Licenciatura. Universidad de Cádiz, 100 pp.

DeGrandpre, M.D., Jenkins, W.J., Wirick, C.D. 1996. Air-Sea exchange of CO₂, O₂ and noble gases in coastal waters. *Coastal Ocean Processes (CoOP) Newsletter* 3, 7.

DeGrandpre, M.D., Hammar, T.R., Wallace, D.W.R., Wirick, C.D. 1997. Simultaneous mooring-based measurements of seawater CO₂ and O₂ of Cape Hatteras, North Carolina. *Limnol. Oceanogr.*, 42, 21-82.

Dickson, A.G. 1981. An exact definition of total alkalinity and a procedure for the estimation of alkalinity and inorganic carbon from titration data. *Deep-Sea Res.*, 28(6): 609-623.

Dickson, A.G. 1992. The development of the alkalinity concept in marine chemistry. *Mar. Chem.*, 40: 49-63.

Forja, J.M., Gómez-Parra, A. 1998. Measuring nutrient fluxes across the sediment-water interface using benthic chambers. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 164: 95-105.

Frankignoulle, M., Bourge, I., Wollast, R. 1996. Atmospheric CO₂ fluxes in a highly polluted estuary (the Scheldt). *Limnol. Oceanogr.*, 41: 365-369.

Frankignoulle, M., Abril, G., Borges, A., Bourge, I., Canon, C., Delille, B., Libert, E., Théate, J-M. 1998. Carbon Dioxide Emissions from European Estuaries. *Science*, 282: 434-436.

Frankignoulle, M., Borges, A.V. 2001. European continental shelf as a significant sink for atmospheric carbon dioxide. *Global Biogeochem. Cycles*, 15(3): 569-576.

Gattuso, J.P., Frankignoulle, M., Wollast, R. 1998. Carbon and carbonate metabolism in coastal aquatic ecosystems. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 29: 405-434.

Goff, J.A., Gratch, S. 1946. Low-pressure properties of water from -160F to 212F. *Trans. Am. Soc. Heat. Vent. Eng.*, 52: 95-121.

Goyet, C., Brewer, P.G. 1993. Biochemical Properties of the Oceanic Carbon Cycle. En: Modeling Oceanic Carbon Interaction (J. Willebrand y D.L.T. Anderson, Eds.) NATO ASI Series, Springer Verlag, vol. I: 271-297.

Howland, R.J.M., Tappin, A.D., Uncles, R.J., Plummer, D.H., Bloomer, N.J. 2000. Distributions and seasonal variability of pH and alkalinity in the Tweed Estuary, UK. *Sci. Total Environ.*, 251/252: 125-138.

Johnson, K.M., Sieburth, J. McN., Williams, P.J. leB., Braendstroem, L. 1987. Coulometric TCO₂ analysis for marine studies: Automation and calibration. *Mar. Chem.*, 21: 117-133.

Kempe, S. 1982. Long-term records of CO₂ pressure fluctuations in fresh waters. En: Degens, E.T. (ed.) Transport of carbon and minerals in major world rivers, Pt.1. Mitt. Geol.-Paläont. Inst. Univ. Hamburg, SCOPE/UNEP Sonderbd. 52, pp:91-332.

Kempe, S. 1984. Sinks of the antropogenically enhanced carbon cycle in surface fresh waters. *J. Geophys. Res.*, 89/D3: 4657-76.

Kempe, S., Pettine, M., Cauwet, G. 1991. Biogeochemistry of european river. En: Biogeochemistry of Major World Rivers (E.T. Degens, S. Kempe y J. Richey, Eds.). SCOPE Report 42, New York. J. Wiley and Sons, pp: 169-211.

Kempe, S. 1995. Coastal seas: A net source or sink of atmospheric carbon dioxide? LOICZ, Texel, The Netherlands.

Liss, P.S., Slater, P.G., 1974. Flux of gases across the Air-Sea Interface. *Nature*, 247:181-184.

Liss, P.S., Merlivat, L. 1986. Air-Sea gas exchange rates: Introduction and synthesis. En: The Role of Air-Sea Exchange in Geochemical Cycling (P. Buat-Menard, Ed.). Reidel, Boston, Massachusetts, pp: 113-129.

Martins, O., Probst, J.-L. 1991. Biogeochemistry of Major World Rivers (E.T. Degens, S. Kempe y E. Richey, Eds.). Wiley, New York, pp: 127-155.

Millero, F.J., 1992. En: Chemical Oceanography (F. J. Millero y M. L. Sohn, eds.). CRC Press, Boca Raton (USA). pp: 305-322.

Millero, F.J. 1995. Thermodynamics of the carbon dioxide system in the oceans. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 59: 661-677.

Murphy, P.P. 1996. The carbonate system in seawater: laboratory and field studies. Tesis doctoral. Universidad de Washington. 288 pp.

Ortega, T. 1996. Caracterización de la reactividad de especies químicas en estuarios mediante técnicas de simulación. Tesis de Licenciatura. Universidad de Cádiz. 149 pp.

Ortega, T. 2001. Flujos de Carbono Inorgánico en sistemas costeros de la Península Ibérica. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz, 390 pp.

- Park, K. 1969. Oceanic CO₂ system: an evaluation of ten methods of investigation. *Limnol. Oceanogr.*, 14: 179-186.
- Raymond, P.A., Caraco, N.F., Cole, J.J. 1997. Carbon dioxide concentration and atmospheric flux in the Hudson River. *Estuaries*, 20: 381-390.
- Raymond, P.A., Bauer, J.E., Cole, J.J. 2000. Atmospheric CO₂ evasion, dissolved inorganic carbon production, and net heterotrophy in the York River estuary. *Limnol. Oceanogr.*, 45: 1707-1717.
- Robertson, J.E., Watson, A.J. 1992. Thermal skin effect of the surface ocean and its implications for CO₂ uptake. *Nature*, 358:737-740.
- Roy, R.N., Roy, L.N., Lawson, M., Vogel, K.M., Moore, C.P., Davis, W., Miller, F.J. 1993. Thermodynamics of the dissociation of boric acid in seawater at S=35 to 55°C. *Mar. Chem.*, 44: 243-248.
- Smith, S.V. 1985. Physical, chemical and biological characteristics of CO₂ gas flux across the air-water interface. *Plant Cell Environ.*, 8: 387-398.
- Smith, S.V., Hollibaugh, J.T. 1993. Coastal metabolism and the oceanic organic carbon balance. *Rev. Geophys.*, 31: 75-89.
- Walsh, J.J. 1991. Importance of continental margins in the marine biogeochemical cycling of carbon and nitrogen. *Nature*, 350: 53-55.
- Wanninkhof, R., Thoning, K. 1993. Measurements of fugacity of CO₂ in surface water using continuous and discrete sampling methods. *Mar. Chem.*, 44: 189-204.
- Watson, A.J., Robinson, C., Robertson, J.E., Williams, P.J. LeB, Fasham, M.J.R. 1991a. Spatial variability in the sink for atmospheric carbon dioxide in the North Atlantic. *Nature*, 350: 50-53.
- Watson, A.J., Upstill-Goddard, R.C., Liss, P.S. 1991b. Air-sea gas exchange in rough and stormy seas measured by a dual-tracer technique. *Nature*, 349: 145-147.
- Weiss, R.F. 1974. Carbon dioxide in water and seawater: the solubility of a non-ideal gas. *Mar. Chem.*, 2: 203-215.

Weiss, R.F. 1981. Determinations of carbon dioxide and methane by dual catalyst flame ionization chromatography and nitrous oxide by electron capture chromatography. *J. Chromatogr. Sci.*, 19: 611-616.

Whitman, W.G. 1923. Preliminary experimental confirmation of the two-films theory of gas absorption. *Chem. Metall. Eng.*, 29: 146-148.

Wollast, R. 1991. The coastal organic carbon cycle: fluxes, sources and sinks. En: *Ocean Margin Processes in Global Change* (R.F.C. Mantoura , J.-M. Martin y R. Wollast, Eds.). Chichester, U.K., Wiley and Sons, pp: 365-381.

4. COMPORTAMIENTO DE NUTRIENTES EN ESTUARIOS

4.1. INTRODUCCIÓN

Aunque el concepto de nutrientes en el medio marino puede ser muy amplio, en este capítulo, como es habitual en oceanografía, se aplicará este término de manera restringida a las sales inorgánicas solubles de Ni, P y Si.

Estos nutrientes se encuentran generalmente en concentraciones mayores en agua dulce que en agua de mar y, mientras que el fósforo puede ser un elemento limitante para el crecimiento fitoplanctónico durante ciertas estaciones del año en algunos estuarios, el nitrógeno es el principal factor limitante de la producción primaria en estas zonas y, en general, en las aguas costeras. El silicio, a su vez, es un elemento esencial para el crecimiento del exoesqueleto de diatomeas, radiolarios y ciertas esponjas. La reducción de la sílice en aguas naturales puede suprimir la actividad metabólica de la célula y puede limitar la producción de dichas estirpes del fitoplancton.

Aston (1980) resumió una lista de características físicas, químicas, sedimentológicas y biológicas del medio que están implicadas en el comportamiento de los nutrientes en los estuarios:

1. La mezcla de agua dulce y salada y los correspondientes cambios en el volumen de agua en el estuario producidos por la acción de las mareas, provocan cambios temporales de período corto en los aportes de nutrientes y gases disueltos desde fuentes marinas y dulces, si bien los estuarios están generalmente enriquecidos en nutrientes con respecto a las aguas oceánicas, debido en muchos casos a la contaminación provocada por la agricultura intensiva en las áreas que drenan los ríos tributarios.
2. La circulación, y especialmente la estratificación de algunos estuarios, genera la posibilidad de variaciones verticales y horizontales en las concentraciones de nutrientes en un estuario.
3. El régimen de corrientes en aguas costeras y estuáricas permite la deposición de varios tipos de material sedimentario. La deposición y resuspensión de sedimentos en estuarios puede influir sobre el conjunto de constituyentes disueltos en aguas estuáricas, incluidos los nutrientes.

4. Las reacciones químicas que suceden durante la mezcla estuárica pueden provocar la retirada o adición de los nutrientes disueltos a la lámina de agua del estuario.
5. La producción biológica primaria y el metabolismo de toda la biota tienen una influencia notable en la presencia y distribución de nutrientes en las aguas estuáricas.

La concentración de los elementos nutrientes es variable tanto temporal como espacialmente en las aguas de los ríos y del mar. La fuente original de la mayor parte del nitrógeno y del fósforo en los estuarios es el meteorismo de las rocas y el lixiviado de suelos terrestres (Day, 1981). La mayor parte de los compuestos de nitrógeno y de fósforo acceden a los estuarios a través de los ríos, existiendo una fracción minoritaria aportada por el agua del mar y las precipitaciones. La actividad antropogénica es una fuente predominante de nutrientes en algunos sistemas (Carpenter et al., 1969; Ryther y Dunstan, 1971; Nixon, 1981); ya que una gran cantidad de nitrógeno y fósforo es transportada por los vertidos urbanos, agrícolas e industriales (Jaworski, 1981). El incremento de la producción de vertidos y de la utilización de fertilizantes en la agricultura ha provocado una entrada masiva de N y P inorgánicos en los estuarios durante las tres últimas décadas. No obstante, la contribución relativa de las distintas fuentes de nutrientes a los estuarios difiere sensiblemente de un sistema estuárico a otro.

El ciclo de los nutrientes en un estuario, consiste en un conjunto de relaciones complejas entre los sedimentos, el agua sobrenadante y los organismos. Los nutrientes son retirados por las plantas, regenerados en la columna de agua a través de la actividad microbiana y la excreción animal y, principalmente, regenerados en sedimentos a través de la actividad de los microorganismos bentónicos (Pomeroy y Wiegert, 1981).

Los estuarios han sido descritos a veces como trampas (e.g. Odum, 1971; Hobbie et al., 1975) o como sistemas exportadores de nutrientes hacia aguas costeras (e.g. Nixon, 1987). A pesar de la proliferación de las investigaciones sobre el tema, en la actualidad no existe consenso sobre el destino de los nutrientes que acceden a los estuarios (Nowicki y Oviatt, 1990). El concepto de que los estuarios actúan como trampas de nutrientes ha prevalecido en la bibliografía al respecto durante años (e.g. Biggs y Howell, 1984) y se consideraba que los procesos involucrados eran principalmente de naturaleza física y química (floculación y sedimentación en las zonas de mezcla) o procesos biológicos debidos a su asimilación por el fitoplancton. Sin embargo, revisiones

posteriores (e.g. Nixon, 1987) han sugerido que estos sistemas sólo pueden retener un pequeño porcentaje de los nutrientes que reciben anualmente. Por esta razón, otro aspecto controvertido en la actualidad es la contribución a la producción en aguas costeras que tiene la exportación de nutrientes desde los estuarios (Nowicki y Oviatt, 1990).

En lo que respecta al nitrógeno inorgánico disuelto, al igual que en la generalidad de los sistemas acuáticos, el nitrato, el nitrito y el amonio constituyen las tres formas más abundantes en los sistemas estuáricos (Lippson et al., 1981). De las tres, el nitrato es el compuesto que presenta las mayores concentraciones en el estuario.

Aunque el nitrógeno molecular (N_2) es la forma más abundante de nitrógeno en los estuarios, no es directamente aprovechable por plantas y animales. Las formas más importantes para los procesos biogeoquímicos son las especies inorgánicas y los compuestos de nitrógeno orgánico, ambos en sus formas disueltas y particuladas (Aston, 1980). Las algas verdeazuladas fijan nitrógeno molecular atmosférico, convirtiendo N_2 en una forma aprovechable por las plantas (por ejemplo, NO_3^-). Las bacterias fijadoras de nitrógeno también proporcionan nitrógeno aprovechable (Lippson et al., 1981). El nitrógeno inorgánico accede a las aguas estuáricas desde drenajes superficiales (Windom et al., 1975), suelos marismos y sedimentos intermareales (Haines, 1979), aguas oceánicas cercanas (Dunstan y Atkinson, 1976), fijación de nitrógeno (Webb, 1981), precipitaciones y regeneración en la columna de agua.

En relación al silicato, trabajos realizados hace algunos años en estuarios japoneses indicaban que generalmente existía en ellos relación lineal entre el silicato disuelto y la clorinidad (Kobayashi, 1967). Posteriormente, Burton et al. (1970), en muestreos realizados en el estuario del Southampton, encontraron también un comportamiento conservativo para el silicato. Esta relación lineal entre SiO_2 y salinidad confirma que no se produce una retirada de silicato de la fase disuelta en los primeros estadios del proceso de mezcla. No obstante, en otros trabajos, se ha encontrado una ligera retirada (no biológica) de silicato disuelto, si bien siempre a valores de salinidad muy bajos (0-2), como por ejemplo sucede en el estuario del Clyde (Mackay y Leatherland, 1976), si bien para la mayor parte del gradiente de salinidad los valores observados se aproximan estrechamente a una relación lineal con la salinidad. En trabajos posteriores se ha seguido observando

un comportamiento del silicato en disolución similar a lo anteriormente descrito (Flegal et al., 1991; Shengquan et al., 1993; Balls, 1994).

4.1.1. Reactividad del fósforo inorgánico en sistemas estuáricos

El fósforo es uno de los elementos terrestres más importantes ya que influye, controla y participa en muchos de los procesos biogeoquímicos que ocurren en la biosfera. Incluso se sugiere que las interacciones entre el ciclo del fósforo y otros ciclos químicos globales controlan muchas características básicas de la biosfera (tales como el contenido en oxígeno en la atmósfera), (Jahnke, 2000).

A diferencia del resto de elementos biogeoquímicos mayoritarios (tales como C, N, S, O y H), las reacciones de oxidación-reducción del fósforo juegan un papel minoritario a la hora del control tanto de la reactividad como de la distribución del mismo en el medio ambiente.

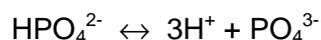
En los sistemas naturales, el fósforo se presenta casi exclusivamente con un estado de oxidación de "+5"; es decir, se encuentra como fosfato (PO_4^{3-}) y, en mayor o menor medida, todas las formas de fósforo disuelto o particulado son formas combinadas, complejadas o ligeramente modificadas de este ión.

En las aguas naturales se encuentran cantidades considerables de fósforo inorgánico y orgánico disuelto y fósforo particulado, aunque el fósforo también aparece en forma coloidal y formando parte de la materia orgánica.

El fósforo presente en los sistemas costeros tiene un origen doble: alóctono y autóctono. El primero posee diversas fuentes: unas puntuales (tales como efluentes domésticos e industriales) y otras difusas (como son las escorrentías agrícolas y la erosión química y física de rocas continentales). Por otro lado, la mayor parte del fósforo de procedencia autóctona es aquel que accede a la fase disuelta a través de mineralización de la materia orgánica consolidada en los sedimentos (Rossi y Premazzi, 1991).

a) Especiación del fósforo

El fosfato (PO_4^{3-}) es el anión completamente dissociado del ácido fosfórico (H_3PO_4), y coexiste con otras especies ácidas según los siguientes equilibrios de hidrólisis:



A los valores de pH típicos de los sistemas acuáticos, el ión HPO_4^{2-} es la especie predominante de fósforo inorgánico, sobre todo a los valores de pH del agua de mar. En este medio, la presencia de cationes tales como Ca^{2+} , Mg^{2+} y Na^+ , que forman pares iónicos con las distintas especies del fosfato, altera significativamente la especiación del ácido fosfórico en relación con la que presenta en las aguas continentales de baja fuerza iónica.

La reactividad química del fosfato en sistemas acuáticos es, así, altamente dependiente tanto de la composición como del pH de la disolución. Las reacciones de complejación y las reacciones ácido-base no sólo son importantes en sistemas marinos, sino que también influyen en la reactividad del fósforo en sistemas acuáticos dulces y, por ende, en sistemas estuáricos.

Con diferencia, el apatito es el mineral de fosfato más abundante, engloba más del 95% de todo el fósforo de la corteza terrestre y es también uno de los constituyentes principales del fósforo particulado en los sistemas acuáticos. Su fórmula general es $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$, donde X puede ser F^- (Fluoroapatito), OH^- (Hidroxiapatito) o Cl^- (Clorapatito).

El apatito tiene una estructura cristalina hexagonal con largos canales abiertos y paralelos al eje "c". En su forma pura, F^- , OH^- o Cl^- ocupan los sitios a lo largo de este eje. Sin embargo, dado el carácter abierto del entramado cristalino del apatito, pueden aparecer muchos sustitutos minoritarios, por lo que es muy difícil encontrar formas puras.

De entre los iones que pueden producir sustitución, el CO_3^{2-} es, con diferencia, el más importante, seguido por Na^+ , SO_4^{2-} y Mg^{2+} . El apatito también puede ser producido por los organismos vivos (huesos,...). Actualmente se piensa que el fosfato que se incorpora al apatito autógeno (de nuevo origen) es proporcionado primariamente a través de la descomposición de materiales orgánicos en los sedimentos marinos.

El fósforo está presente también en forma orgánica, ya que la gran mayoría de biomoléculas fundamentales necesarias para la vida lo contienen, puesto que están enlazadas a largas y complicadas moléculas orgánicas por medio de uniones éster con fosfato (un buen ejemplo son los ácidos nucleicos ADN y ARN).

b) Comportamiento del fósforo en la mezcla estuárica

En la figura 4.1. se presenta un modelo de caja simple con los posibles flujos de fósforo en un estuario tipo.

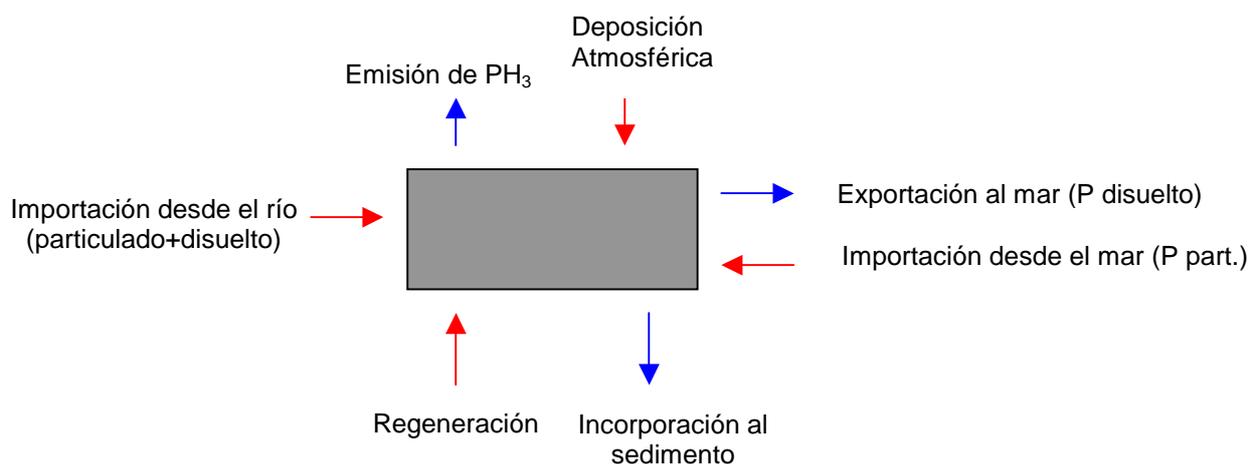


Figura 4.1. Modelo esquemático de los flujos de fósforo en un estuario típico (adaptado de Van Beusekom y De Jonge, V.N., 1997)

El ciclo del fósforo en los estuarios es muy similar al que experimenta dicho elemento en el océano, si bien en las zonas estuáricas tiene algunas características específicas, como:

- a) La contribución de fosfato procedente de aguas residuales (urbanas, agrícolas e industriales) es mucho más importante en ambientes estuáricos que en el medio oceánico.
- b) La entrada de fósforo transportado fluvialmente, tanto en forma disuelta como particulada, es muy variable en los estuarios en una escala de tiempo relativamente corta.
- c) Debido a la escasa profundidad de estos sistemas, las aguas estuáricas están sujetas a un intenso intercambio con los sedimentos en comparación con las aguas oceánicas lo que, lógicamente, afecta a la tasa de intercambio de fosfato.

d) El ciclo biológico del fósforo en estuarios depende de factores ambientales que pueden cambiar radicalmente en una pequeña escala de tiempo en comparación con el océano.

El comportamiento del fosfato inorgánico disuelto durante la mezcla estuárica fue estudiado por Stefánsson y Richards (1963) en el estuario del Columbia. En contraste con el nitrato, que exhibía una relación lineal con la salinidad, los niveles de fosfato inorgánico disuelto se mantuvieron prácticamente constantes a lo largo de todo el gradiente de salinidad (0-32). Esto planteaba una doble hipótesis:

- 1) O bien ambas aguas (dulce y salada) contenían una concentración de fosfato idéntica.
- 2) O existe algún proceso de regulación o tamponamiento que mantiene el fósforo disuelto en unos valores constantes, independientemente de los cambios de salinidad. Esta idea ya había sido apuntada previamente por Carrit y Goodgal (1954).

Más recientemente, Vaithyanathan et al., (1993), han encontrado un comportamiento similar en el estuario del Hooghly (India).

Por otro lado, Lebo (1991) encontró una pauta de comportamiento para este elemento a lo largo del estuario del Delaware que constituye un patrón común en otros muchos estuarios. El contenido en fósforo más alto se produce en la zona fluvial, la más próxima a descargas antropogénicas, apareciendo en la zona de mezcla valores más bajos. Los análisis revelaron que el fósforo particulado estaba asociado a la materia orgánica particulada, a los óxidos de hierro y aluminio y formando apatito. Más cerca del límite marino del estuario, la fracción de fósforo asociado a óxidos metálicos decrecía con el aumento de salinidad, lo que suponía su retorno parcial a la forma disuelta, si bien no se observaron cambios en el fósforo apatítico. De hecho, existen ejemplos en los que se sugiere que la formación y retención de apatitos autigénicos es el proceso mayoritario de retirada de fósforo del ciclo biogeoquímico costero (Van Beusekom y De Jonge, 1997).

Las concentraciones de fosfato disuelto en muchos estuarios se mantienen dentro de un estrecho intervalo debido a las reacciones de adsorción/desorción. Los primeros en sugerir la idea de un fosfato disuelto "regulado" fueron Carrit y Goodgal (1954) cuando propusieron que el fosfato era retirado de la fase disuelta en aguas dulces turbias, transportado sobre partículas a lo largo de los estuarios y vuelto a liberar en forma disuelta (no todo) con el incremento de salinidad.

El mecanismo general de regulación del fosfato se basa en el equilibrio entre la fuente de fosfato disuelto y el reservorio de fósforo ligado a partículas (Froelich, 1988). Cuando la concentración de fosfato difiere de la de equilibrio, el fosfato es liberado o adsorbido hasta que se alcanza dicho equilibrio. Según Froelich (1988), en los ambientes oceánicos, costeros y estuáricos, el mecanismo regulador del fosfato viene a significar la influencia de los sedimentos, tanto los del lecho como los que están en suspensión, en el control de la concentración del fosfato reactivo disuelto en el agua, manteniendo dicha concentración en unos valores próximos a un valor constante sin que le influya la retirada de origen biológico de fosfato ni las reacciones de entrada del mismo. De esta manera, siempre se dispone de un reservorio de fósforo reactivo importante y potencialmente disponible para el crecimiento del fitoplancton en situaciones en que se requiera. Fox (1989) sugiere que este equilibrio aparente entre la concentración de fosfato y el fósforo asociado a partículas resulta de la asociación del fósforo con óxidos de hierro (y, quizás, de aluminio). Shengquan (1993) observó en la Bahía de Hangzhon el mismo comportamiento que Lebo (1991) en el Delaware.

Se ha comprobado que, en estuarios con una turbidez elevada, el ciclo del fósforo está controlado por la interacción del material particulado con el fósforo disuelto, mientras que en estuarios altamente productivos está controlado fundamentalmente por procesos biológicos (Lebo et al., 1992).

En un estudio de De Jonge y Villerius (1989), en el estuario del Ems, se puso de manifiesto la existencia de dos mecanismos antagónicos que pueden regular el ciclo del fósforo (uno en la zona más marina del estuario y el otro en su zona más fluvial). En el mar y en la zona marina del estuario, se forma calcita que es transportada aguas arriba hasta la zona más fluvial del estuario, formando parte de la materia suspendida. Durante este transporte, parte del fosfato se adsorbe sobre la calcita. Debido a que el pH es bajo en la zona fluvial del estuario, parte de la calcita se disuelve y, consecuentemente, una fracción del fosfato se desorbe. Otros componentes de la materia suspendida, tales como minerales de la arcilla y óxidos de Fe hidratados también pueden adsorber fosfato. Las condiciones en la zona alta del estuario (salinidad y pH bajos) son particularmente favorables para que estos minerales adsorban el fosfato que se encuentra disponible debido a la disolución de la calcita. Así, durante el transporte corriente arriba, parte de la fracción de fosfato asociado a la calcita cambia a los lugares de adsorción de los minerales no-calcíticos, produciéndose el esperado comportamiento no conservativo del fosfato a lo largo del estuario. Además, el proceso de liberación del fosfato puede

estimularse por la alta producción de CO₂ resultante de la mineralización biológica de la materia orgánica en las zonas media y alta del estuario. Los procesos de transporte de sedimento y adsorción y desorción de fosfato favorecen la acumulación de fosfatos marinos así como la retención de fosfatos de origen fluvial en el estuario. La cinética de retirada de fosfato por parte de minerales bajo condiciones de baja salinidad sugiere que la adsorción es el proceso principal de esa retirada de fosfato. Así, dependiendo de la naturaleza del adsorbente, existirá una fracción de fosfato disuelto en equilibrio con una fracción de fosfato adsorbida, actuando esta última como un tampón. Bajo condiciones estuáricas, también opera un mecanismo de tamponamiento. Su existencia fue postulada por Carrit y Goodgal (1954) y por Stefánsson y Richards (1963) y demostrada por Pomeroy et al. (1965). Los experimentos han demostrado que tanto adsorción como desorción juegan un importante papel en el mecanismo de tamponamiento. Los experimentos de De Jonge y Villerius (1989) conducentes a examinar las propiedades de la materia particulada para adsorber fosfato en el estuario del Ems, concluyeron que el equilibrio de adsorción se ajusta a una isoterma de Freundlich.

Aunque la eutrofización costera es un problema global, aún existe desacuerdo acerca de si los estuarios actúan como fuentes o sumideros de fósforo inorgánico disuelto. No obstante, muchos estudios demuestran que la interacción del fósforo inorgánico disuelto con el material particulado representa probablemente uno de los mecanismos más importantes que afectan a la geoquímica del fósforo en sistemas estuáricos (Froelich, 1988; Balls, 1994; Conley et al., 1995). Recientemente, Pratska et al. (1998) indicaron que la liberación o retirada de fósforo inorgánico disuelto en estuarios puede predecirse por medio del coeficiente de distribución (K_D) de fósforo entre las fases particulada y disuelta. Dicho coeficiente proporciona un valor cuantitativo del reparto de concentración de fósforo entre ambas fases. K_D está muy influido por tres parámetros físico-químicos: Salinidad, pH y potencial redox (Millward y Turner, 1995). Si bien K_D se ha empleado mucho en el estudio del comportamiento de metales traza en estuarios (e.g. Benoit et al., 1994, Wood et al., 1995) existen pocos trabajos en los que se haya empleado en el estudio del fósforo (e.g. De Jonge y Villerius, 1989; Caraco, 1990 y Fang, 2000). Aún así, parece ser que el valor de K_D para el fósforo posee el mismo orden de magnitud que el de los metales traza (tales como Cu, Ni y Zn) (Balls, 1989) lo que indica que el fósforo también es un elemento con una clara afinidad por el material particulado.

En todos los experimentos en los que se ha examinado el efecto de la temperatura sobre la adsorción de fosfato se encontró que la magnitud de la retirada de fosfato de la fase

disuelta se incrementaba con el aumento de la temperatura (Carritt y Goodgal, 1954, Chen et al., 1973, Romankevich, 1984).

Otra serie de trabajos (Carritt y Goodgal, 1954, Burns y Salomons, 1969) han determinado el pH óptimo para la adsorción de fosfato. Los resultados muestran un amplio máximo en el intervalo de pH entre 3 y 7, donde, de acuerdo con las curvas de disociación del ácido fosfórico dadas por Kester y Pytkowicz (1967) la principal especie disuelta será H_2PO_4^- . En agua de mar de pH en torno a 8 sólo el 1% del fósforo en disolución estará como H_2PO_4^- , siendo la especie principal HPO_4^{2-} (87%). Tomando estos valores obtenidos en experimentos de laboratorio, este resultado implica que, en un estuario donde el agua dulce de bajo pH se mezcla con agua de mar de pH próximo a 8, la eficiencia de la retirada de fósforo de la fase disuelta será mayor en la parte del estuario más próxima a la zona fluvial. Carritt y Goodgal (1954), Burns y Salomons (1969) mostraron que, para un pH fijado, el incremento en salinidad a lo largo de un gradiente implica un decrecimiento en la magnitud de retirada de fosfato de la fase disuelta. Esto puede deberse al bloqueo de los centros preferenciales de adsorción por parte de iones tales como Cl^- y SO_4^{2-} .

Según trabajos de laboratorio (Pomeroy et al., 1965, Froelich, 1988) parece ser que el mecanismo de adsorción de fosfato disuelto sobre partículas suspendidas se produce por medio de un proceso de sorción reversible que consta de dos pasos:

1. Adsorción (o desorción) inicial sobre (o desde) las superficies reactivas. Primera etapa, de cinética relativamente rápida (de minutos a horas).
2. Penetración lenta por difusión en la fase sólida del fosfato adsorbido, desde la superficie hacia el interior de las partículas. Segunda etapa; de cinética lenta de días a meses. Este segundo paso es dependiente de la "historia temporal" de la sorción superficial previa (paso 1) y de las características de la capa sólida a través de la que se produce la difusión.

Las partículas naturales de la fracción arcilla que poseen una cubierta superficial de óxidos hidratados de Fe y Al, tienen una gran capacidad para adsorber fosfato en este segundo paso y para mantener bajas concentraciones de fosfato disuelto en equilibrio.

Es importante destacar que, de acuerdo con este modelo de dos pasos, la retirada inicial de fosfato sería un proceso reversible.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

4.2.1. Análisis de nutrientes

Las muestras se han analizado con un autoanalizador de flujo continuo segmentado de los denominados de tercera generación, concretamente por medio de un equipo TRAACS 800 de Bran Luebbe configurado especialmente para el análisis de fosfato, silicato, nitrito, nitrito+nitrato y amonio. Una descripción detallada de los circuitos analíticos fue realizada por Forja (1991). En las condiciones en que se realiza el análisis de fosfato, la concentración obtenida corresponde a la de fosfato total.

4.2.2. Especiación del fosfato

La determinación de las distintas formas de fosfato se realizó, de forma manual, por espectrofotometría-colorimetría en tres tipos distintos de muestras:

1. Muestras sin filtrar. Para obtener la concentración de fosfato total.
2. Muestras filtradas por 0.22 μm . A fin de obtener la concentración de fosfato disuelto, antes de ser analizadas, un grupo de muestras se filtró por 0.22 μm (filtros de acetato; GSWPO-2500, Millipore).
3. Filtros. Para obtener la concentración de fósforo particulado. A fin de que no se alteraran en la operación, dichos filtros se almacenaron en tubos de ensayo a los que se añadieron 8 mL de HCl 0.1M (al final, el filtro se deshace y queda una disolución acidificada).

En todos los casos, la metodología para la determinación de fosfato fue la indicada en Grasshoff et al. (1983) y los análisis se realizaron siempre por duplicado. Brevemente, el procedimiento fue el siguiente:

A 10 mL de muestra se añaden, por este orden, 0.2 mL de solución acidificada de ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$) y, posteriormente, 0.2 mL de una mezcla reactiva compuesta por heptamolibdato amónico tetrahidratado y tartrato antimónico potásico [$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y $\text{K}(\text{SbO})\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6$, respectivamente]. Se agita la mezcla y se esperan 40 minutos para que se desarrolle el color. A continuación se mide la absorbancia a 880 nm en un espectrofotómetro. (en el caso de los filtros no se disponía de 10 mL de

muestra, por lo que se tomaron 5 mL de muestra a los que se añadieron otros 5 mL de una disolución de NaOH 0.1M).

Experimentalmente se han determinado las tres fracciones de fosfato: fosfato total, disuelto y particulado. Se ha encontrado un elevado grado de concordancia entre los valores de la concentración experimental de fósforo total y la suma de las concentraciones de fosfato disuelto y fósforo particulado, determinadas también experimentalmente. La figura 4.2. se presenta como ejemplo típico de dicho grado de concordancia.

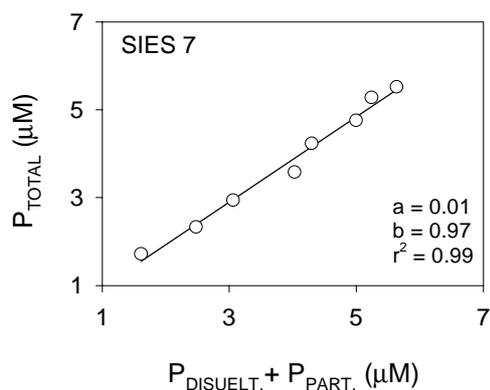


Figura 4.2. Concentración experimental de fósforo total frente a la suma de las concentraciones experimentales de fosfato disuelto y fósforo particulado en SIES 7.

4.2.3. Ensayos Realizados

El comportamiento genérico de nutrientes (nitrato, nitrito, amonio, fosfato y silicato) ha sido caracterizado en tres experimentos, concretamente los denominados SIES 1, 2 y 3. Cada uno de estos tres ensayos representó un gradiente de salinidad distinto del estuario del Guadalquivir, con lo que se reflejaron distintos instantes de marea (incluso SIES 3 representó una ampliación de la zona más fluvial del estuario).

De forma más específica, posteriormente se ha estudiado la reactividad del fosfato a lo largo de distintos gradientes de salinidad en los experimentos SIES 4, 5 y 6 (gradientes completos de salinidad) y en SIES 7, 8 y 9 (“ampliaciones” de la zona más fluvial del estuario).

Por último, se ha caracterizado la reactividad del fosfato a lo largo de distintos gradientes de pH en los ensayos denominados SIES 10, 11 y 12.

El diseño y las características de estos doce experimentos han sido detallados prolijamente en el apartado 2.4. del Capítulo 2.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.3.1. Comportamiento de nutrientes

Las figuras 4.3. y 4.4. muestran las variaciones de las concentraciones de nitrógeno inorgánico disuelto y de los distintos nutrientes con la salinidad en los tres ensayos descritos. Existe, en los tres experimentos, un gradiente muy acusado de la concentración de nitrógeno en el estuario.

La representación del nitrógeno inorgánico total frente a la salinidad se aproxima, en todos los ensayos, a una línea recta, lo que podría expresarse en términos de un comportamiento conservativo. En el primer ensayo de simulación, la concentración de nitrógeno inorgánico en el agua de río tiene un valor próximo a 400 μM . En cambio, en los otros dos ensayos, esta concentración se encuentra en torno a 600 μM . Esto sucede ya que la concentración de nitrógeno inorgánico en el agua del Guadalquivir es elevada, y en los dos últimos ensayos se reproducen situaciones de bajar en las que la influencia marina en la mezcla estuárica posee menor importancia. Por tanto, el agua de río presenta una mayor influencia en la mezcla, lo que se refleja en una mayor concentración de nitrógeno inorgánico en forma disuelta.

La especie mayoritaria de nitrógeno en el estuario es, con diferencia, el nitrato. De hecho, a salinidades bajas, supone del orden del 95% del nitrógeno presente. En este sentido, las evoluciones de las concentraciones de nitrato a lo largo del estuario son similares a las encontradas para el nitrógeno inorgánico total, tanto en lo que respecta a las concentraciones máximas como a su comportamiento. Este comportamiento conservativo del nitrato ha sido descrito en distintos sistemas estuáricos (e.g. Shengquan et al., 1993). No obstante, existen otros trabajos donde se describen pérdidas o ganancias de este nutriente (Mackay y Leatherland, 1976), generalmente asociadas a la actividad biológica.

En lo que respecta a la concentración de nitrito, puede considerarse relativamente constante en los dos primeros ensayos de simulación, entre 0.5 y 1.5 μM . Dada la magnitud de estas variaciones, no es posible destacar ninguna tendencia general. En el tercer ensayo de simulación se observa un aumento importante de la concentración de nitrito, posiblemente debida a su formación mediante procesos de nitrificación y

nitratorreducción durante el período de tiempo que fue necesario emplear para establecer en el simulador los gradientes de salinidades que se deseaban reproducir.

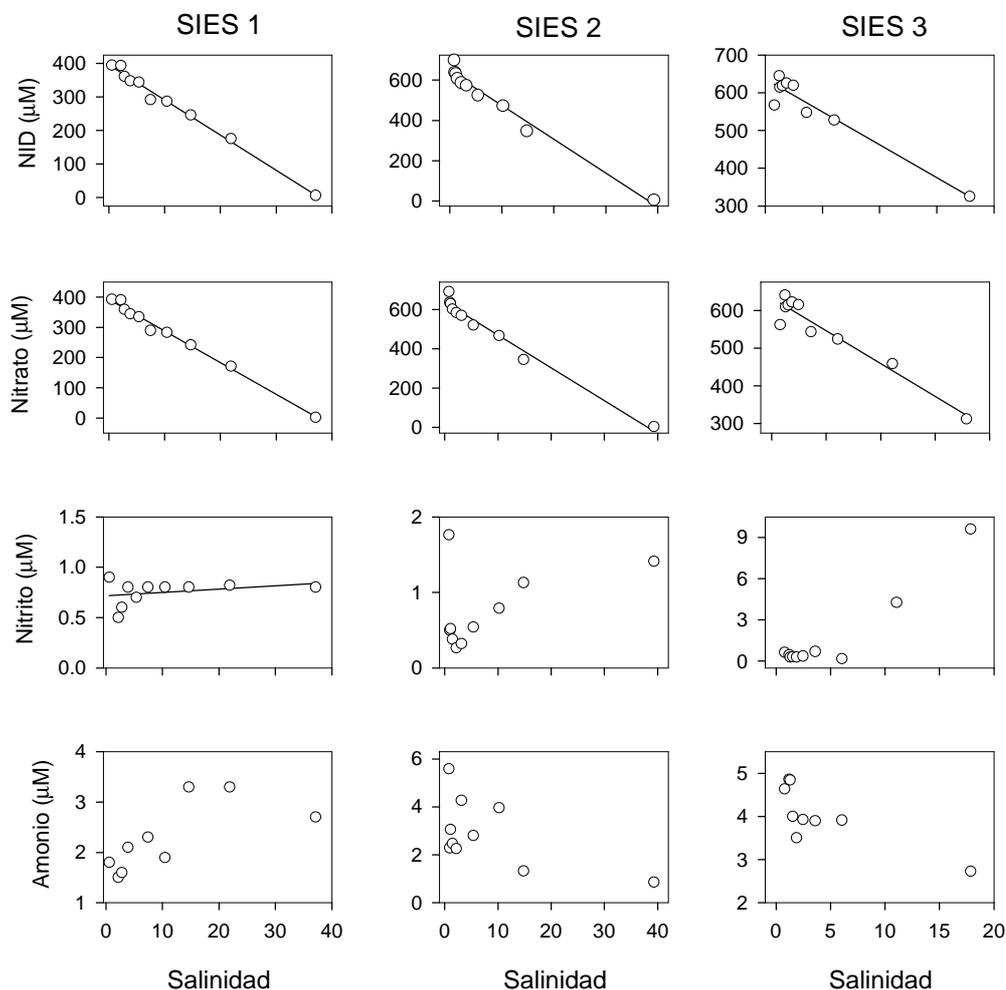


Figura 4.3. Variación de la concentración de nitrato, nitrito, amonio y nitrógeno inorgánico total (calculado como suma de los tres anteriores) a lo largo de los distintos gradientes de salinidad simulados en SIES 1, 2 y 3.

La concentración de amonio también experimenta variaciones distintas en cada caso. En el primer ensayo existe un aumento, mientras que en los dos últimos ensayos parece apreciarse una disminución. Al igual que en el caso del nitrito, la explicación de estas variaciones no es inmediata, y posiblemente se encuentre relacionada con procesos de nitrificación y desnitrificación, cuyo efecto es poco cuantificable ya que depende en gran medida del desarrollo de los microorganismos responsables de estos procesos.

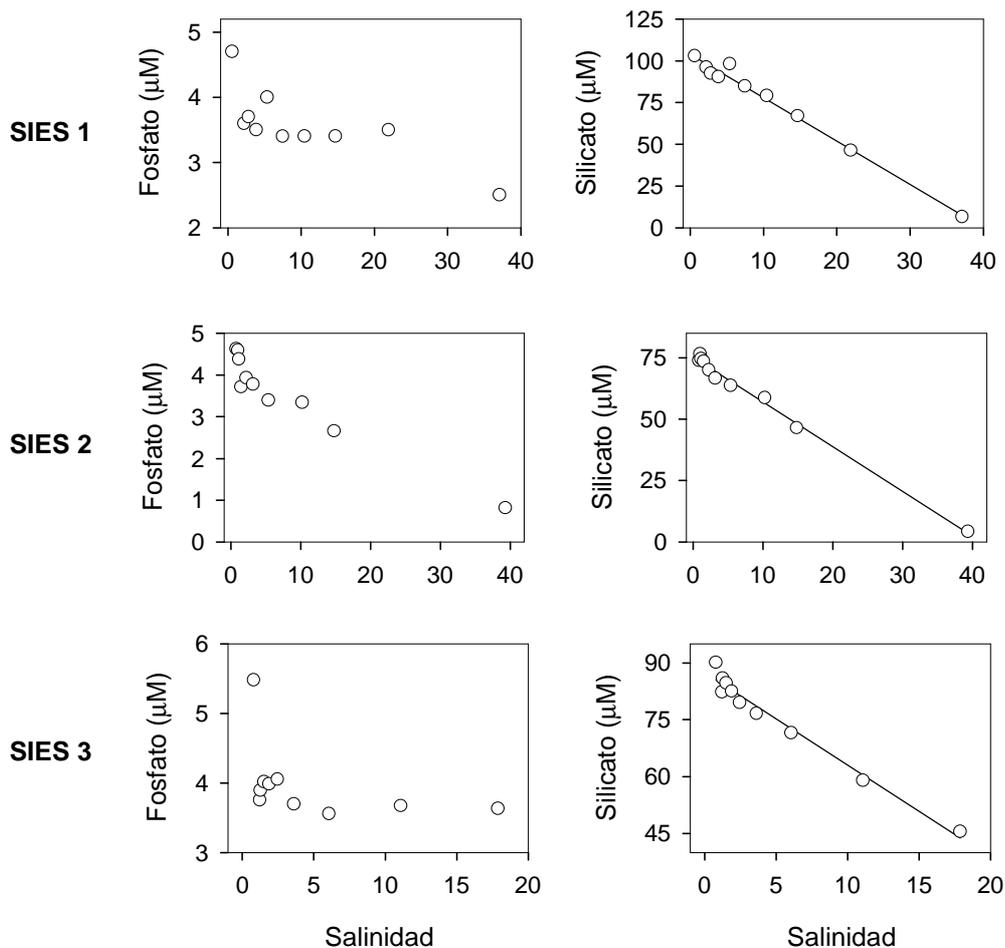


Figura 4.4. Variación de la concentración de fosfato y silicato a lo largo de los distintos gradientes de salinidad simulados en SIES 1, 2 y 3.

Tanto para el primero como para el resto de ensayos, se observa un típico origen continental para el silicato en el estuario del Guadalquivir, con valores próximos a $100 \mu\text{M}$ en la parte más fluvial (figura 4.4.). Su variación con la salinidad es relativamente lineal, consecuencia de la baja reactividad que presenta este nutriente en las zonas estuáricas (Burton et al., 1970; Wollast, 1973; Flegal et al., 1991; Shengquan et al., 1993).

En todos los ensayos de simulación que se describen, la concentración de fosfato muestra un comportamiento claramente no conservativo, con importantes pérdidas a bajas salinidades. Esto se aprecia especialmente en SIES 3 donde se realizó una ampliación de la zona más fluvial del estuario. Este hecho viene a confirmar la ventaja que supone el disponer de un equipo que puede trabajar con un gradiente de salinidad tan pequeño como se desee, de tal manera que se puede acotar la zona en la que se presupone que el elemento o compuesto objeto de estudio desarrollará una mayor

reactividad. Esta alta reactividad del fósforo ha sido ha sido descrita en numerosos estuarios (Aston, 1980; Clark et al., 1991; Flegal et al., 1991; Lebo, 1991; Windom et al., 1991; Lebo et al., 1994; Pitkänen y Tamminen, 1995) y generalmente se atribuye a su adsorción sobre óxidos de hierro y aluminio, a su conversión en apatitos o a su incorporación biológica.

4.3.2. Reactividad del fósforo inorgánico en estuarios

a) Influencia de la salinidad en la reactividad del fosfato

Los primeros experimentos conducentes a la caracterización de la reactividad del fósforo fueron denominados SIES 4, 5 y 6. En dichos ensayos se simuló un gradiente de salinidad completo, que abarcaba desde una salinidad típica de agua de río (≈ 0) hasta una salinidad típica de agua de agua de mar (≈ 36). En una primera aproximación a este estudio, los valores de concentración de fosfato con los que se trabajó oscilaron, en el agua de río, entre 40 y 50 μM , que representan unas concentraciones unas cuatro veces superiores a los valores ambientales normales.

En la figura 4.5. se presenta la variación de la concentración de fosfato inorgánico a lo largo del gradiente de salinidad en los tres experimentos.

Como era esperable, se observa que, en los tres ensayos, el fosfato presentó un comportamiento no conservativo, a tenor de los resultados obtenidos en un gran número de trabajos relacionados con el comportamiento de este compuesto (e.g., Bale y Morris, 1981; Lebo, 1991; Pratska et al., 1998; Fang., 2000). La zona de mayor reactividad, como puede observarse en la figura 4.5., se localiza en la parte alta del estuario, es decir, la de menor salinidad, ya que es la zona donde las curvas se separan más de la línea de dilución teórica.

El pH también puede tener importancia en el comportamiento estuárico del fosfato. De hecho, en estos tres experimentos se ha variado el gradiente de pH en cada uno, para determinar si influye o no en la evolución de la concentración de fosfato. Esta cuestión se discute más adelante.

Estos tres primeros experimentos, al igual que SIES 1, 2 y 3, pusieron de manifiesto la necesidad de realizar una “ampliación” de la zona menos salina del estuario a fin de poder caracterizar mejor la reactividad del fosfato. Además, se planteó determinar cómo

podría influir sobre la reactividad del fosfato un gradiente de pH a tres salinidades fijas. El primer punto generó la segunda batería de experimentos (SIES 7, 8 y 9) y, el segundo, generó la tercera (SIES 10, 11 y 12).

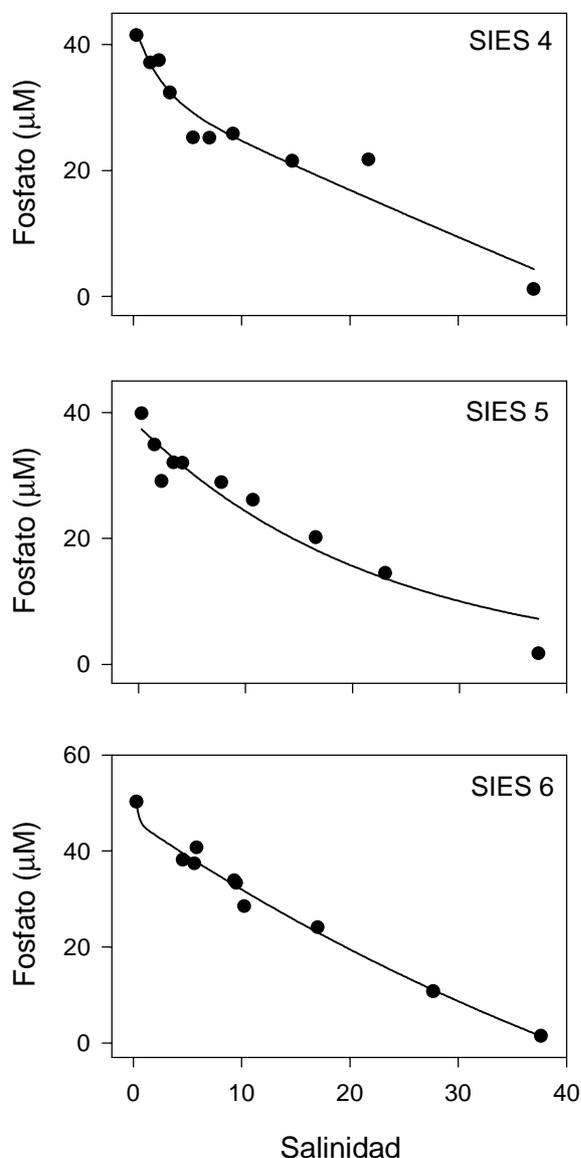


Figura 4.5. Variación de la concentración de fosfato a lo largo de los gradientes de salinidad generados en los ensayos SIES 4, 5 y 6.

Tanto en SIES 4, 5 y 6 como en SIES 7, 8 y 9, se han calculado las pérdidas de fosfato en la fase disuelta. Teniendo en cuenta que el equipo construido simula un estuario vertical y lateralmente homogéneo, puede hacerse un tratamiento monodimensional del transporte de materia a lo largo del estuario. El flujo F de la sustancia χ a través de una

sección A del estuario, en la que su concentración en la fase disuelta es C, viene dado por la suma del transporte por advección y por difusión (Officer, 1979):

$$F(\chi) = Q \cdot C \pm k \cdot A \cdot (\delta C / \delta x)$$

donde Q es el caudal del río, x es la dimensión longitudinal del estuario y k, el coeficiente de difusión longitudinal. Si se considera el flujo positivo (>0) cuando se produce desde el río hasta el mar, el signo negativo del segundo sumando implica que se trata de una sustancia cuya concentración es mayor en el agua de río que en el agua de mar y viceversa. Admitiendo que, en el estado estacionario, el transporte de sales a través del estuario sería nulo, se tiene que:

$$Q \cdot S - k \cdot A \cdot (\delta S / \delta x) = 0$$

donde S es la salinidad.

Combinando las dos últimas expresiones resulta:

$$F(\chi) = Q \cdot [C \pm S \cdot (\delta C / \delta S)]$$

y expresado como porcentaje de la cantidad total de χ aportada por el río que viene dado por el producto de su caudal por la concentración en él de la sustancia χ ($Q \cdot C_0$),

$$F(\chi) = (100/C_0) \cdot [C \pm S \cdot (\delta C / \delta S)]$$

Por tanto, para calcular la parte de la sustancia χ que se ha perdido en la fase disuelta en un tramo del estuario, tan sólo es necesario establecer el incremento de $F(\chi)$ en dicho tramo.

$$\text{Pérdida} = \Delta F(\chi)$$

Esto último puede hacerse de manera analítica, de manera gráfica o admitiendo que, en una primera aproximación, puede aceptarse como válido el considerar como valor de $(\delta C / \delta S)$ para S_i el valor medio de la pendiente de las rectas que une los puntos experimentales (C_{i-1}, S_{i-1}) , (C_i, S_i) y (C_{i+1}, S_{i+1}) (figura 4.6.). En esta Memoria se ha utilizado siempre el procedimiento analítico.

disolución. Estos programas, que utilizan una amplia base de constantes termodinámicas y distintas aproximaciones para estimar la influencia sobre ellas de la temperatura y fuerza iónica, presentan una extensa relación de posibles compuestos insolubles que pueden formarse y la tendencia termodinámica a que se produzcan estas precipitaciones en base a “índices de saturación”. Es evidente que los resultados que se obtienen mediante su aplicación presentan importantes limitaciones que están relacionadas fundamentalmente con el conocimiento íntegro de la composición de la disolución y con la estimación de las constantes a elevada fuerza iónica (hasta 0.7 M). No obstante, estos resultados pueden ser interesantes en la interpretación de la reactividad del fosfato, al menos desde un punto de vista comparativo entre los diferentes experimentos realizados.

Concretamente, se ha utilizado el modelo de evaluación geoquímico denominado *MINTEQ* (Allison et al., 1991). Dicho programa, desarrollado en Visual Basic, es una versión en entorno Windows del *MINTEQA2* (versión 4.0), el cual fue “liberado” por la USEPA en 1999. El programa *MINTEQA2* es un modelo de especiación del equilibrio geoquímico, empleado frecuentemente para el cálculo de la especiación de metales y de equilibrios de solubilidad en sistemas acuosos diluidos. *MINTEQA2* incluye una base de datos termodinámicas muy extensa, que es accesible a través del programa interactivo *PRODEFA2*. Asimismo, el programa está avalado por diferentes instituciones internacionales, como los consejos de investigación suecos NFR y MISTRA.

De todas las salidas que proporciona el programa, en la discusión de la presente Memoria se ha utilizado el índice de saturación (Ω), que se define como la relación logarítmica entre el producto de actividad iónica (IAP) y la constante del equilibrio de formación del sólido (K):

$$\Omega = \log \frac{IAP}{K}$$

El IAP consiste en el producto de las actividades experimentales de los iones involucrados en la reacción, elevados a los coeficientes estequiométricos correspondientes en cada caso.

De esta forma, si Ω es negativo para un determinado mineral, el sistema está subsaturado respecto a su formación, mientras que si Ω es positivo, indica que existe una tendencia termodinámica a que precipite el compuesto. Para un estudio de los procesos reales que se producen en la disolución, sería necesario disponer de información cinética de estas reacciones de precipitación o disolución.

La base de datos termodinámicos de *MINTEQ* está referida a una temperatura de 25° C y a una fuerza iónica cero, de forma que el programa recalcula las constantes de equilibrio en función de la temperatura y de la fuerza iónica del sistema, utilizando respectivamente la ecuación de Van't Hoff y las de Debye-Hückel o de Davies, según el caso. Realizar estas correcciones es muy importante, ya que, por ejemplo, para algunos apatitos, la solubilidad a 0 °C es 1000 veces superior que a 25 ° C (Nriagu y Moore, 1984).

La utilización de las aproximaciones de Debye-Hückel y Davies para el cálculo de los coeficientes de actividad cuando la fuerza iónica es superior a 0.5 M es discutible. A fuerzas iónicas mayores, como es el caso del medio marino, las correcciones con estas ecuaciones podrían utilizarse pero verificando los resultados en cada sistema. Una posible solución sería considerar la ecuación de Debye-Hückel expandida, que incluye términos que tienen en cuenta las interacciones que ocurren en soluciones más concentradas (Pitzer, 1973).

Se han utilizado los valores experimentales de pH, temperatura y fuerza iónica de las muestras pertenecientes a los tanques en cada uno de los experimentos realizados, así como las concentraciones analíticas de carbono inorgánico, sulfato, cloruro, calcio y fosfato. A partir de la salinidad, y teniendo en cuenta que las relaciones entre los elementos mayoritarios permanece constante en el agua de mar (Millero y Sohn, 1992), se han calculado las concentraciones totales de potasio, sodio, magnesio para todas las muestras analizadas. Aunque no todas las especies están directamente implicadas en la formación de estos compuestos insolubles, sí entran en juego desde el punto de vista de que interaccionan de diferente forma con alguna de las implicadas.

Con anterioridad a la utilización de *MINTEQ*, se realizaron unas pruebas previas con otro programa de modelación geoquímica denominado *Geochemists' Workbench 3.0*, el cual emplea como base de datos termodinámicos la denominada *Lawrence Livermore thermo database*. Dichas pruebas pudieron efectuarse gracias al doctor John Washington de la USEPA (Athens, Georgia) quien permitió el acceso a dicho programa y colaboró en la interpretación de los resultados. Sin embargo, la base de datos del *Geochemists' Workbench 3.0* no es tan potente como la del *MINTEQ* de ahí que, finalmente, se optara por éste último.

En la figura 4.8. se muestran los resultados obtenidos en algunas de estas pruebas previas con el *Geochemists' Workbench 3.0*. Puede observarse cómo existe una importante sobresaturación de distintos tipos de fosfatos cálcicos como hidroxiapatito

($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) y whitlockita ($\beta\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) que disminuye progresivamente con la salinidad. Éstas constituyeron las primeras evidencias de que algún tipo de fosfato cálcico podía estar involucrado en la reactividad del fósforo en los experimentos realizados. Sin embargo, este programa no aporta información sobre otras fases minerales que suelen estar involucradas en la retirada de fosfato en los estuarios, como brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y monetita (CaHPO_4).

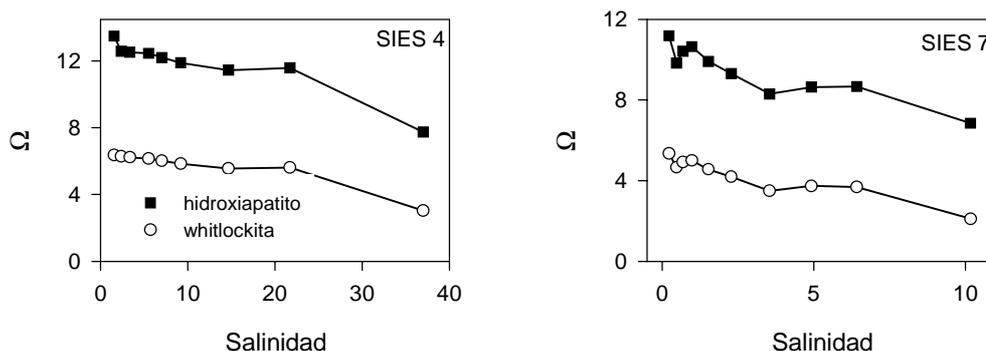


Figura 4.8. Variación del índice de saturación (Ω) con la salinidad calculado con el programa *Geochemists' Workbench 3.0* para los experimentos SIES 4 y 7.

Por esta razón, tras esta primera aproximación, se decidió ampliar la base de datos termodinámicos, empleando para ello el programa *MINTEQ*. En la figura 4.9. se presentan las variaciones de los índices de saturación con la salinidad de todas las fases minerales implicadas aparentemente en la reactividad del fosfato ($\Omega > 0$) para los experimentos 4, 5 y 6. Se ha encontrado sobresaturación respecto a la formación de hidroxiapatito ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3 \cdot (\text{OH})$) en todos los experimentos (SIES 4, 5 y 6), y de whitlockita ($\beta\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) en algunos de ellos (SIES 4 y 5). Otros fosfatos insolubles como la brushita ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), la monetita (CaHPO_4) y el $\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, cuya formación se sospechaba a priori, no presentaron valores de sobresaturación.

El índice de saturación del hidroxiapatito tiende a disminuir con la salinidad y presenta valores altos en todos los casos, comprendidos generalmente entre 4 y 8, e incluso puede alcanzar un valor de 10 en SIES 4. Una excepción a este comportamiento se observa en SIES 6, donde Ω del hidroxiapatito es negativo en la zona más fluvial y tiende a aumentar con la salinidad, hecho probablemente relacionado con el gradiente más intenso de pH impuesto en este experimento. De todas formas, la sobresaturación y la presencia de hidroxiapatito no tiene por qué implicar directamente el crecimiento autigénico del mineral (Matisoff et al., 1981.).

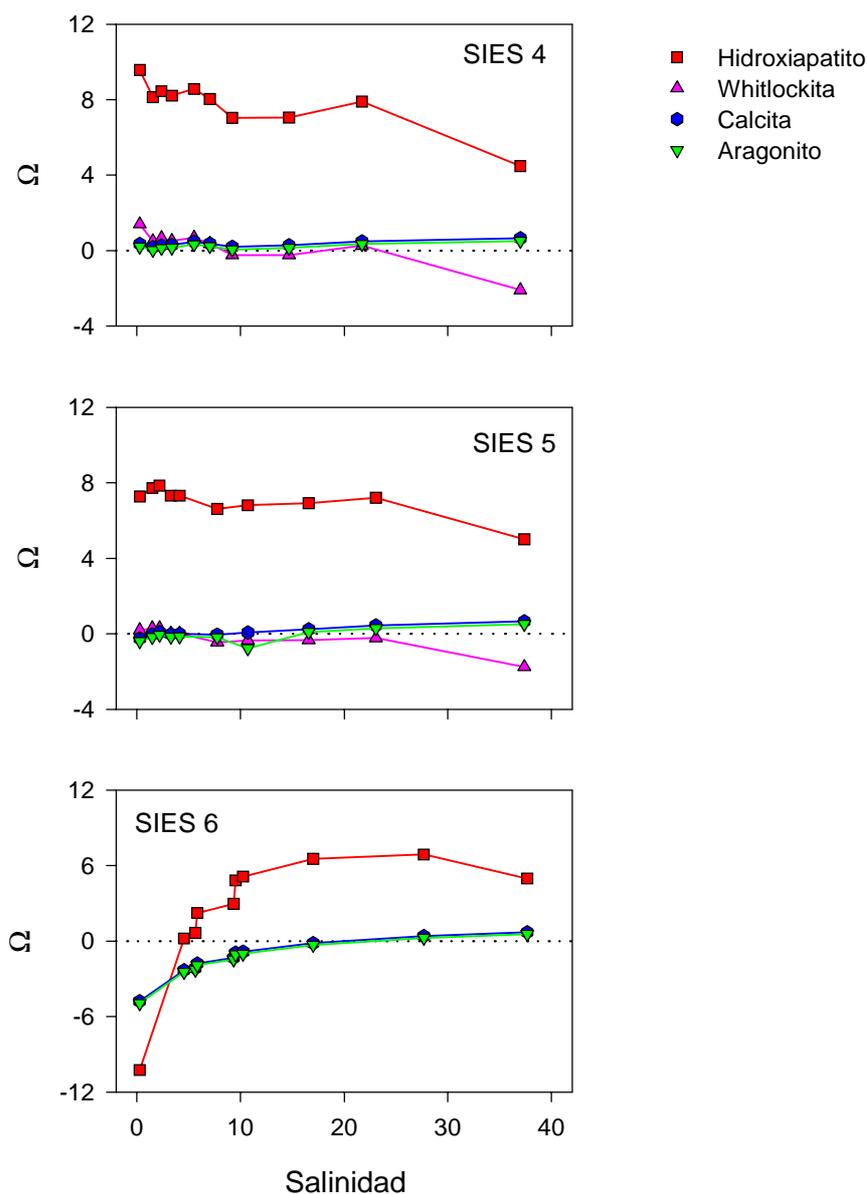


Figura 4.9. Variaciones de los índices de saturación con la salinidad de todas las fases minerales implicadas aparentemente en la reactividad del fosfato en SIES 4, 5 y 6.

En el caso de la whitlockita ($\beta\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), se ha encontrado sobresaturación en parte del gradiente de salinidad en SIES 4 y 5 (entre salinidades de 0 y 5). En este caso, los valores del índice de saturación son mucho menores que para el hidroxiapatito (con su valor máximo próximo a 1.3).

También se han obtenido índices de saturación ligeramente positivos para otros compuestos insolubles, tales como aragonito y calcita. Estos valores son coherentes con los resultados obtenidos por Ortega (2001), que calculó la saturación de estos minerales

a partir de relaciones empíricas de la solubilidad con la salinidad y la temperatura, y con datos encontrados por otros autores en sistemas costeros (Giordani y Hammond, 1985; Barbanti et al., 1995).

Entre los minerales que tiende a formar el fosfato disuelto, el hidroxiapatito ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) es, con diferencia, el que presenta los mayores índices de saturación en todos los experimentos. En la figura 4.9. se observa cómo los valores de saturación para dicho mineral decrecen desde SIES 4 hasta SIES 6, presentando además un comportamiento muy similar en SIES 4 y 5 y algo distinto en SIES 6.

En la formación del hidroxiapatito participan los iones Ca^{2+} , PO_4^{3-} y OH^- . En la figura 4.10. se presenta el logaritmo de las actividades de estas tres especies, junto con el logaritmo del producto de la actividad iónica (IAP) del hidroxiapatito, frente al gradiente de salinidad en los tres ensayos. Puede observarse cómo la actividad del Ca^{2+} aumenta, en todos los casos, con la salinidad y, por tanto, exhibe una tendencia inversa a la experimentada por Ω e IAP. Por el contrario, la evolución de las actividades de PO_4^{3-} y de OH^- es similar a la que presenta el IAP y, por tanto, la tendencia a la formación de hidroxiapatito parece fundamentalmente relacionada con la variación de las concentraciones de estas dos especies. Como se ha apuntado anteriormente, los menores valores de Ω en SIES 6, así como su diferente variación con la salinidad, parecen relacionados con el gradiente de pH en este experimento. El pH medio en SIES 4 y 5 estuvo próximo a 8, mientras que, en SIES 6, tuvo un valor muy cercano a 7. Esta disminución del pH en SIES 6 no sólo afecta a la disponibilidad de iones OH^- , sino que también influye sobre la cantidad de fosfato en forma de PO_4^{3-} y, por tanto, es responsable de las variaciones de Ω encontradas en este ensayo.

Como se ha constatado anteriormente, la parte más fluvial de los estuarios es donde el fosfato presenta una mayor reactividad. Por esta razón, se realizaron tres nuevos experimentos que tenían por objeto ampliar el gradiente de salinidad precisamente en esa zona. Además, se intentó comparar cómo podría verse alterada la retirada de fosfato de la fase disuelta en presencia sólo de calcio (SIES 7) y en presencia de calcio y hierro (SIES 9). En SIES 8 no se añadió hierro al sistema, si bien es el experimento en el que se trabajó con el gradiente de salinidad más reducido de todos (valores entre 0 y 4) a fin de determinar con mayor precisión la elevada reactividad del fosfato.

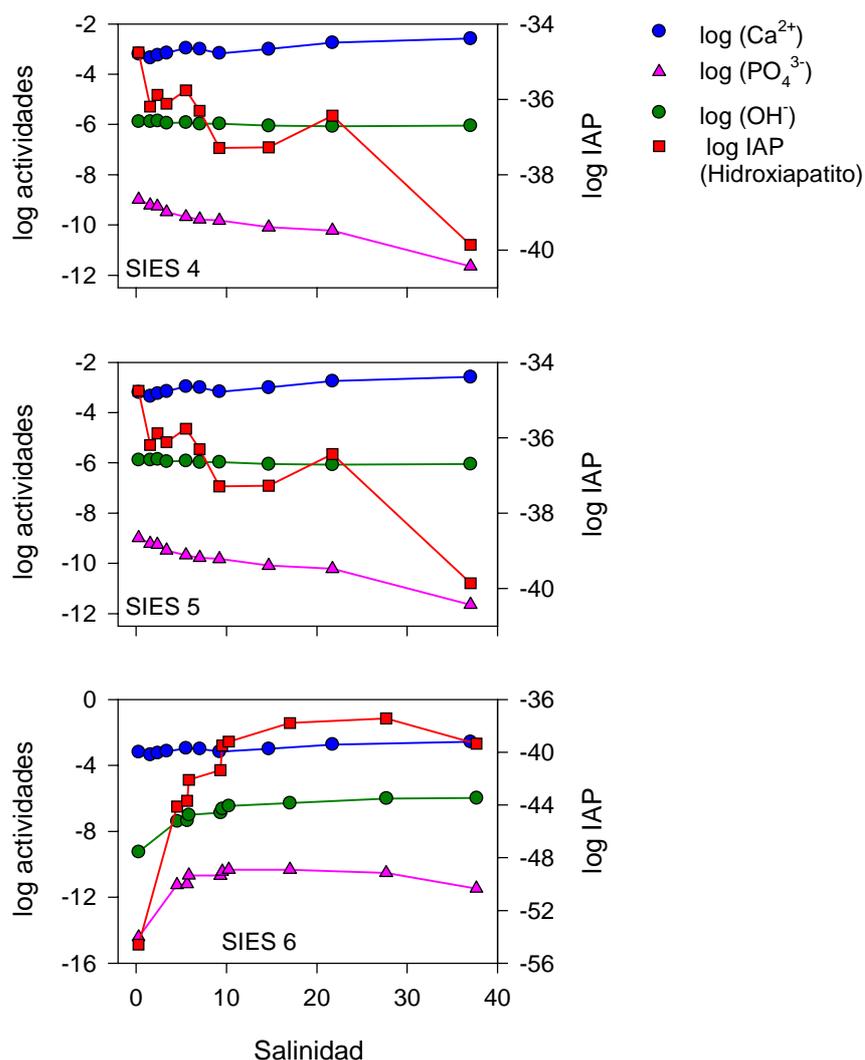


Figura 4.10. Logaritmo de las actividades de Ca^{2+} , PO_4^{3-} y OH^- , junto con el logaritmo del producto de la actividad iónica del Hidroxiapatito, frente al gradiente de salinidad en los tres experimentos SIES 4, 5 y 6.

En la figura 4.11. se presentan las variaciones de concentración de fosfato disuelto y particulado a lo largo del gradiente de salinidad en SIES 7, 8 y 9. Como sucedía en los primeros ensayos, la concentración de fosfato disuelto en esta nueva serie tampoco describe una variación lineal, lo que implica cierta reactividad responsable del comportamiento no conservativo de esta especie ampliamente descrito en la bibliografía (e.g., Bale y Morris, 1981; Lebo, 1991; Pratska et al., 1998; Fang., 2000).

En los tres experimentos la variación de la concentración de fosfato disuelto se ajusta satisfactoriamente a una función exponencial decreciente del tipo:

$$y = a \cdot e^{-b \cdot x} + c \cdot e^{-d \cdot x}$$

donde “y” es la concentración de fosfato inorgánico disuelto, “x” es la salinidad y a, b, c y d son parámetros de ajuste (Tabla 4.1)

Tabla 4.1. Parámetros de ajuste para las regresiones fósforo inorgánico disuelto (PID) frente a salinidad en SIES 7, 8 y 9.

Experimento	a	b	c	d	r ²
SIES 7	1.7542	1.5017	5.0516	0.1656	0.998
SIES 8	3.9577	0.4043	3.8340	0.4038	0.986
SIES 9	3.3504	0.1626	3.5753	0.1226	0.969

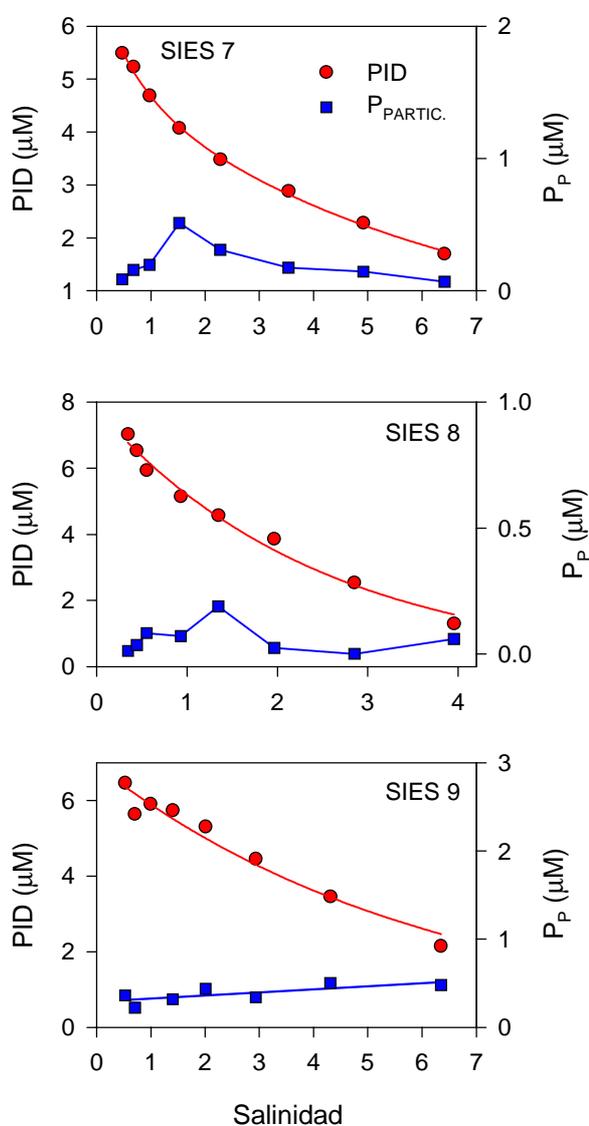


Figura 4.11. Variación de las concentraciones de fosfato inorgánico disuelto (PID) y fósforo particulado (P_P) a lo largo de los gradientes de salinidad generados en SIES 7, 8 y 9.

En la figura 4.11., se muestra también la evolución de la concentración de fósforo particulado a lo largo de los tres gradientes de salinidad. Se aprecia que los mayores valores de concentración de fósforo particulado se alcanzan en SIES 9, seguidos de SIES 7 y 8, respectivamente. Es razonable pensar que debiera suceder así pues, si bien en SIES 7 y 8 sólo existe Ca^{2+} , en SIES 9, la retirada de fosfato puede deberse a su reacción con Ca^{2+} y con Fe^{3+} . Esta cuestión se discute más adelante.

La evolución del contenido de fósforo particulado en SIES 9 es muy regular, oscilando en un estrecho intervalo de valores. Sin embargo, en SIES 7 y 8 existe un máximo de fósforo particulado muy marcado en un valor de salinidad próximo a 1.5. Dicho máximo podría estar relacionado con una mayor reactividad del fosfato disuelto a esa salinidad, reflejada por una mayor pendiente de la curva que representa la evolución del fosfato disuelto en estos dos experimentos. La curva que describe el fosfato disuelto en SIES 9 no es tan pronunciada (ver parámetros de ajuste en Tabla 4.1.), lo que indicaría que tampoco deben existir variaciones importantes en la concentración de fósforo particulado a lo largo de todo el gradiente de salinidad.

En la figura 4.12. se presentan las pérdidas, en tanto por ciento, que experimenta el fosfato en la fase disuelta con el incremento de salinidad en los ensayos SIES 7, 8 y 9.

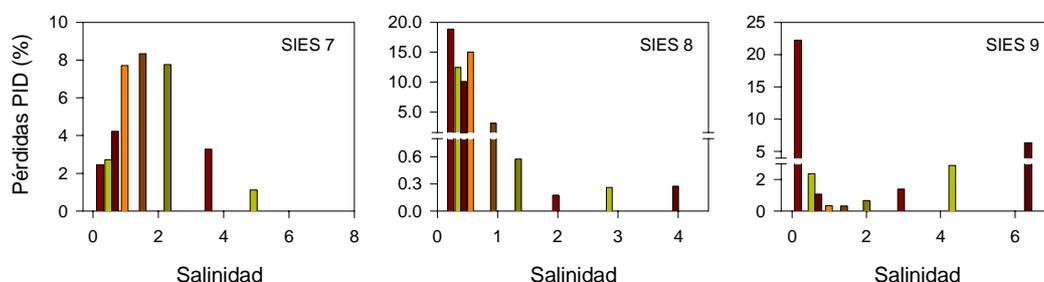


Figura 4.12. Variación de las pérdidas relativas de fosfato inorgánico disuelto (PID) con la salinidad calculadas en los experimentos SIES 7, 8 y 9.

Se observa que, en los tres experimentos, las pérdidas más cuantiosas se producen a las salinidades más bajas, para ir decreciendo progresivamente conforme aumenta la salinidad, describiendo una evolución distinta en cada caso. En cuanto a los valores de las pérdidas, el mayor valor se registra en SIES 9., seguido de SIES 8 y 7, respectivamente. Este mayor valor de las pérdidas encontrado en SIES 9 podría deberse a que se está produciendo una retirada de fosfato de la fase disuelta más eficaz que en

los otros dos experimentos, relacionada con la presencia conjunta de Ca^{2+} y Fe^{3+} . Esa mayor pérdida encontrada en SIES 9 a baja salinidad se traduciría en una mayor concentración de fósforo particulado, hecho señalado anteriormente.

En la figura 4.13. se presentan las variaciones de los índices de saturación (calculados mediante el uso de *MINTEQ*) con la salinidad para todas las fases minerales implicadas aparentemente en los experimentos 7, 8 y 9 ($\Omega > 0$).

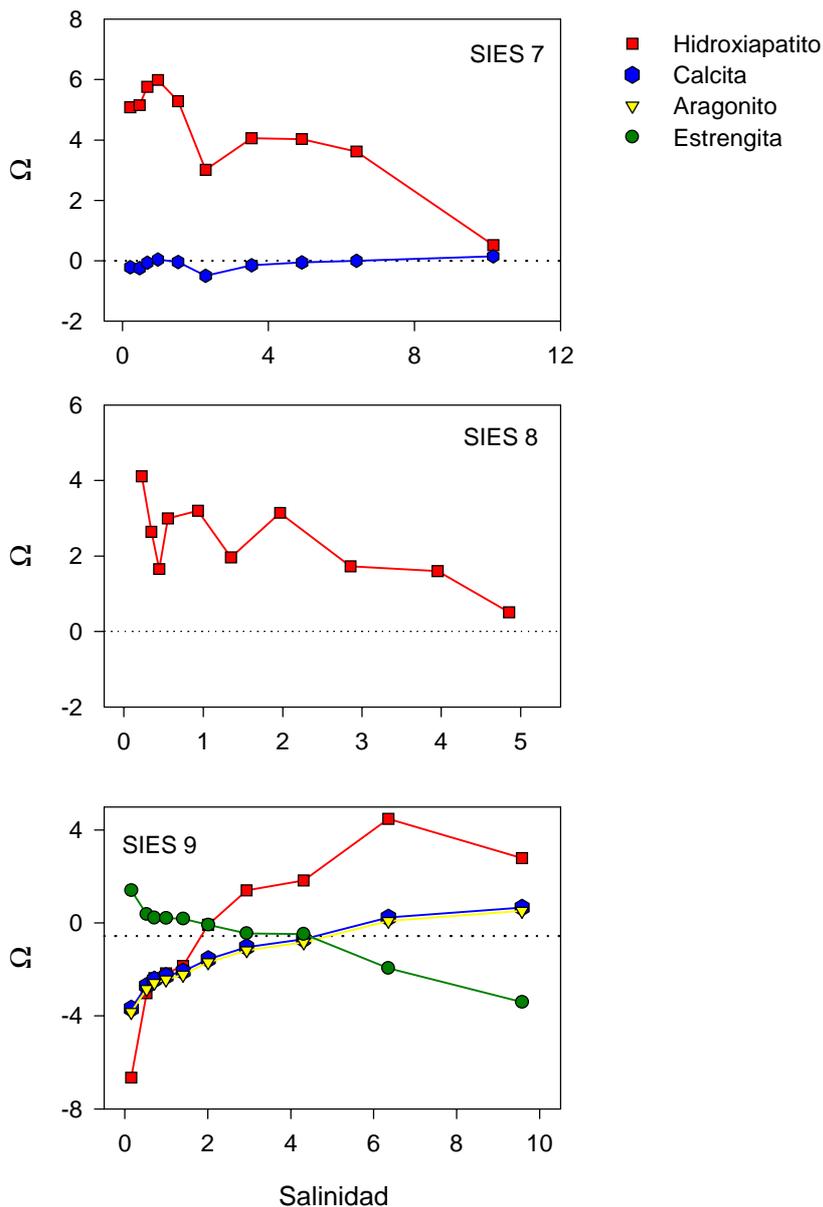


Figura 4.13. Variaciones de los índices de saturación con la salinidad de todas las fases minerales implicadas aparentemente en la reactividad del fosfato en SIES 7, 8 y 9.

Respecto a las posibles fases que participan en la reactividad del fosfato disuelto, se ha encontrado sobresaturación de hidroxiapatito ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$) en todos los experimentos (SIES 7, 8 y 9). Además, en SIES 9, se ha encontrado sobresaturación de estrengita ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) y, en SIES 7 y 9, distintas formas de CaCO_3 .

En los tres casos, el índice de saturación del hidroxiapatito presenta valores menores que los que se registraron en SIES 4, 5 y 6. Lógicamente es debido a que la concentración de fosfato que se empleó en SIES 4, 5 y 6 ($\approx 50\mu\text{M}$) es del orden de cinco veces superior a la empleada en SIES 7, 8 y 9 ($\approx 10\mu\text{M}$).

En SIES 7 y 8 la evolución del índice de saturación del hidroxiapatito es similar (si se tiene en cuenta que el gradiente de salinidad en SIES 7 es más amplio que en SIES 8), si bien los valores en SIES 8 son menores que en SIES 7. En este sentido, y como se ha discutido anteriormente, las diferencias de valores de IAP o Ω entre estos dos experimentos se debe a los gradientes de pH simulados, con valores próximos a 7.9 en SIES 7 y a 7.6 en SIES 8. No obstante, a lo largo de todo el gradiente de salinidad, los valores del índice de saturación se encuentran por encima de cero en ambos casos.

Por el contrario, en SIES 9 el índice de saturación del hidroxiapatito se encuentra por debajo de cero hasta una salinidad próxima a 2, creciendo a partir de aquí hasta estabilizarse en un valor en próximo a 3.5. En este caso, el fosfato disuelto, además de participar en la posible formación de hidroxiapatito, podría tomar parte también en la formación de estrengita, dada la presencia de hierro en este experimento. Así, la evolución del índice de saturación de la estrengita es justo la contraria a la del hidroxiapatito, comenzando con valores positivos hasta una salinidad de 4, para ir decreciendo progresivamente hasta alcanzar un valor próximo a -4. Los bajos índices de saturación en la parte más fluvial de SIES 9, así como su evolución a lo largo del gradiente de salinidad, también se encuentra relacionado con la influencia del pH. A este respecto, el pH medio de SIES 9 está próximo a 7.2, aunque parte de valores cercanos a 6.5 para las muestras de menor salinidad.

Al igual que en SIES 4, 5 y 6, en SIES 7, 8 y 9 también se ha encontrado sobresaturación de ciertos minerales cálcicos (como el aragonito y la calcita). En el caso de SIES 9, además de estos minerales cálcicos, también podrían encontrarse otros férricos (tales como goetita y hematita) que son comunes en estuarios reales.

No obstante, en todos los casos, estos minerales presentan valores de sobresaturación cercanos al equilibrio a lo largo de todo el gradiente de salinidad.

Análogamente al la discusión anterior para los ensayos SIES 4, 5 y 6, en la figura 4.14. se han representado simultáneamente la evolución con la salinidad de los logaritmos de las actividades de los iones que participan en la formación del hidroxiapatito, así como del producto de actividad iónica. En el caso de SIES 9, también se incluyen estas variaciones relacionadas con la formación de estrengita.

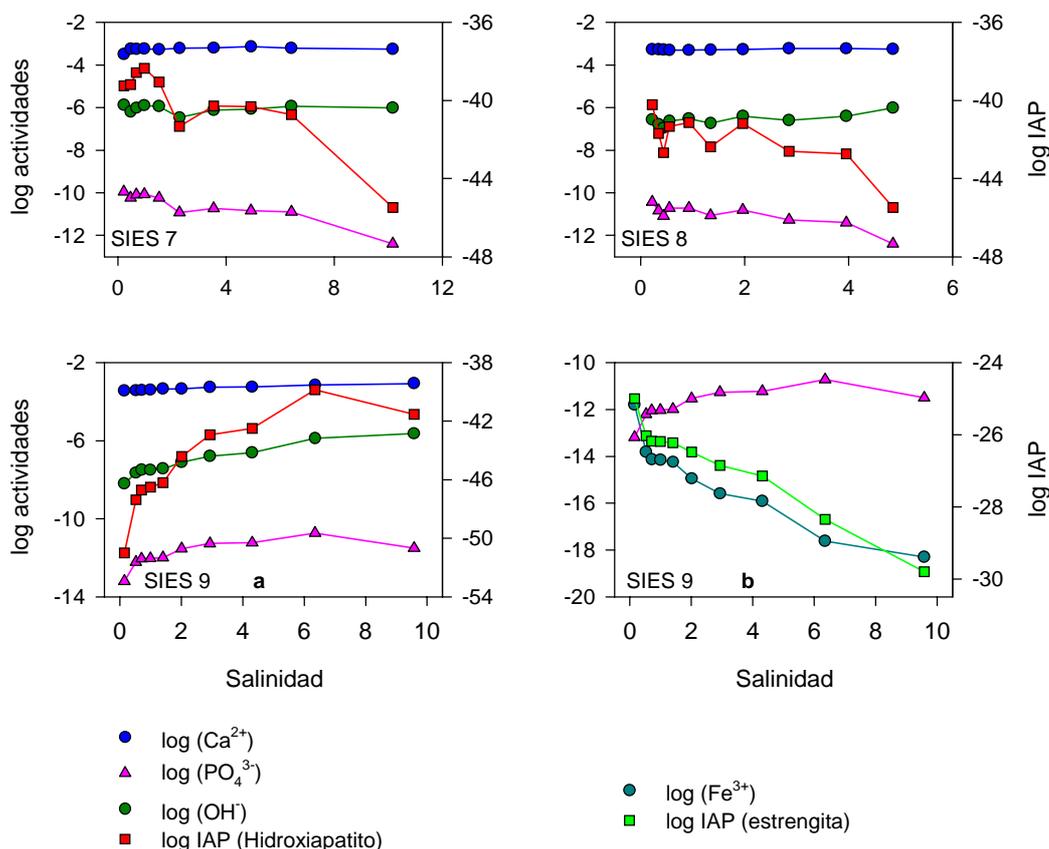


Figura 4.14. Logaritmo de las actividades de Ca^{2+} , PO_4^{3-} y OH^- , junto con el logaritmo del producto de la actividad iónica del Hidroxiapatito, frente al gradiente de salinidad en SIES 7, 8 y 9 (a). En SIES 9 (b), se representa el log IAP de la Estrengita.

En los tres casos se observa que el Ca^{2+} posee un comportamiento similar y sus actividades oscilan entre los mismos valores, lo que denota que no es la especie que influye en la distinta evolución del hidroxiapatito en los tres experimentos. Sin embargo, tanto la actividad de PO_4^{3-} como de OH^- poseen un comportamiento análogo en SIES 7 y 8 (lo que produciría una evolución similar del hidroxiapatito en ambos) que difiere notablemente del de SIES 9. Por tanto, son estas dos especies las que hacen que el hidroxiapatito se comporte de distinta manera en SIES 9, aunque no sólo ellas. En este caso, además de que el logaritmo de la actividad de fosfato difiere del de SIES 7 y 8,

también dicho fosfato debe repartirse en la formación potencial de hidroxiapatito y estrengita, fundamentalmente a bajas salinidades, donde la actividad de Fe^{3+} supera incluso a la de PO_4^{3-} .

b) Influencia del pH en la reactividad del fosfato

En la figura 4.15 se presenta la variación de concentración de fosfato a lo largo de un gradiente de pH para los experimentos SIES 10, 11 y 12.

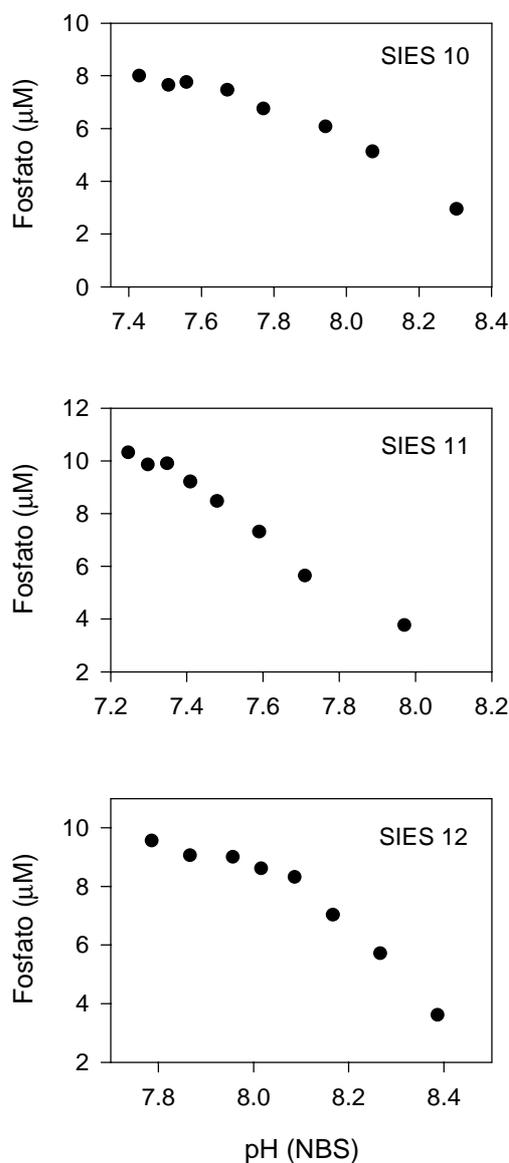


Figura 4.15. Evolución de la concentración de fosfato disuelto a lo largo del gradiente de pH (NBS) generado en los experimentos SIES 10, 11 y 12.

En el apartado 2.4. del Capítulo 2 se han descrito las características de los experimentos SIES 10, 11 y 12, en los que se pretendía analizar el comportamiento del fosfato a lo largo de un gradiente de pH para tres salinidades distintas. El pH no es un índice conservativo de mezcla (como la salinidad o la clorinidad), si bien es la variable que experimenta un gradiente en su concentración en los tres ensayos mencionados. Por tanto, para caracterizar el comportamiento del fósforo, se ha intentado encontrar un índice conservativo de mezcla relacionado con el pH: la concentración total de protones ($[H^+]_{TOTAL}$).

En los tres experimentos descritos, el pH se determinó en la escala NBS (sin duda la escala más utilizada y en la que se han obtenido un mayor número de datos en los estudios oceánicos). No obstante, las constantes de disociación más precisas se encuentran determinadas en la escala de concentración total del ión hidrógeno (pH_T , Hanson, 1973). Por esta razón se ha procedido a transformar de escala de pH los valores experimentales obtenidos. Esta transformación requiere primeramente la conversión de los datos a la escala de concentración libre del ión hidrógeno (pm_H , Bates y Macaskill, 1975) y, posteriormente, transformar sus valores a la escala de concentración total del ión hidrógeno, considerando para ello la concentración de HSO_4^- y el correspondiente cambio de unidades.

La relación entre las escalas NBS y pm_H es empírica y, para el tipo de electrodos empleados en este trabajo, ha sido desarrollada por Ortega (2001) para un amplio intervalo de variaciones de la salinidad y la temperatura. De esta forma, para relacionar las dos escalas, las diferencias entre los valores experimentales de pH en ambas ($\Delta pH = pm_H - pH(NBS)$) se han ajustado a una función análoga a la propuesta por Culberson (1981) y Mehrbach (1973). La expresión utilizada es una aproximación de la ecuación de Debye-Hückel, y tiene la forma:

$$\Delta pH = \frac{-A_{DH} I^{1/2}}{1 + 2,33 I^{1/2}} + (B_0 + B_1 t) + (B_2 + B_3 t) I^{1/2} + (B_4 + B_5 t) I$$

donde I es la fuerza iónica, que se obtuvo a partir de la salinidad (DOE, 1994):

$$I = 19.492 \cdot S / (1000 - 1.005 \cdot S)$$

A_{DH} es la pendiente de Debye-Hückel (Bates, 1973), que depende de la temperatura. Para su obtención se representó el valor de A_{DH} dado por Klotz y Rosenberg (1977) frente la temperatura (0 – 40 °C), ajustándose a una función cuadrática del tipo:

$$A_{DH} = a t^2 + b t + c$$

siendo $a = 4.108 \cdot 10^{-6}$, $b = 7.3 \cdot 10^{-4}$, $c = 0.4883$, ($r^2 > 0.999$) y t es la temperatura en grados centígrados.

En la expresión para la obtención de ΔpH , t es la temperatura en grados centígrados y B_0, B_1, \dots, B_5 son parámetros de ajuste (Tabla 4.2.).

Tabla 4.2. Parámetros de ajuste de la ecuación que relaciona las escalas de pH "NBS" y "pm_H" para un amplio intervalo de salinidades (10- 40) y temperaturas (5– 30 ° C) (Ortega, 2001).

Parámetro	
B_0	-0.12496218
B_1	0.00305691
B_2	-0.13519419
B_3	0.00778120
B_4	0.15854334
B_5	-0.00598306

A continuación, los datos de pm_H se transforman a pH_T mediante la expresión (Culberson, 1981):

$$[H^+]_T = m_H \cdot (1 + \beta_{HSO_4} [SO_4^{2-}]_T) \cdot (1 - S/1000)$$

donde β_{HSO_4} es la constante de formación de HSO_4^- :

$$\beta_{HSO_4} = [HSO_4^-] / [H^+] \cdot [SO_4^{2-}]$$

El valor de β_{HSO_4} ha sido determinado en agua de mar a distintas temperaturas y salinidades por diversos investigadores (e.g. Khoo et al., 1977; Bates y Calais, 1981; Millero, 1983). Millero (1986) propuso, basándose en la ecuación de Bates y Calais (1981), la siguiente expresión para la obtención de β_{HSO_4} en aguas estuáricas:

$$\log \beta_{HSO_4} = A/T + B + C \ln T$$

donde A, B y C son parámetros que dependen de la salinidad ($A = -1226.966 + 65.6 S^{0.5}$; $B = 6.09405 - 0.4502 S^{0.5} + 1.3525 \cdot 10^{-2} S$; $C = 0$). Esta ecuación permite pasar de una escala de pH a otra con error máximo de 0.008 unidades de pH.

De esta forma, los valores calculados de PH_T permiten conocer la suma de los protones libres y los asociados al ión sulfato en los distintos experimentos realizados. No obstante, la concentración de protones en esta escala sigue sin ser un índice conservativo de mezcla, ya que existen en el agua de mar numerosas especies protolíticas capaces de cambiar su distribución relativa cuando se encuentran sometidas a un gradiente de pH. Si se analizan los principales equilibrios ácido-base presentes, puede definirse como índice conservativo la cantidad total de protones en el medio, incluyendo los asociados a estos equilibrios:

$$[H^+]_{TOTAL} = [H^+]_T + [HF] + [B(OH)_3] + [Si(OH)_4] + [HCO_3^-] + 2 \cdot [CO_2] + 3 \cdot [H_3PO_4] + 2 \cdot [H_2PO_4^-] + [HPO_4^{2-}]$$

Ecuación, que de forma extendida, se expresaría como sigue:

$$[H^+]_{TOTAL} = [H^+]_T + \frac{[F]_T \cdot [H^+]}{[H^+] + K_{HF}} + \frac{[B]_T \cdot [H^+]}{[H^+] + K_{B(OH)}} + \frac{[Si]_T \cdot [H^+]}{[H^+] + K_{Si(OH)}} + \frac{[C.I.] \cdot K_1 \cdot [H^+]}{[H^+]^2 + K_1 \cdot [H^+] + K_1 \cdot K_2} +$$

$$+ 2 \cdot \frac{[C.I.] \cdot [H^+]^2}{[H^+]^2 + K_1 \cdot [H^+] + K_1 \cdot K_2} + 3 \cdot \frac{[P]_T \cdot [H^+]^2}{[H^+]^3 + K_1 \cdot [H^+]^2 + K_1 \cdot K_2 \cdot [H^+] + K_1 \cdot K_2 \cdot K_3} +$$

$$2 \cdot \frac{[P]_T \cdot K_1 \cdot [H^+]}{[H^+]^3 + K_1 \cdot [H^+]^2 + K_1 \cdot K_2 \cdot [H^+] + K_1 \cdot K_2 \cdot K_3} + \frac{[P]_T \cdot K_1 \cdot K_2}{[H^+]^3 + K_1 \cdot [H^+]^2 + K_1 \cdot K_2 \cdot [H^+] + K_1 \cdot K_2 \cdot K_3}$$

Las concentraciones de estas especies pueden calcularse a partir de las concentraciones analíticas y las correspondientes constantes de disociación en la escala de la concentración total del ión hidrógeno. En la Tabla 4.3., se muestran las constantes de disociación empleadas.

Tabla 4.3. Constantes de disociación de los principales equilibrios ácido-base en el agua de mar recogidas en D.O.E.

Ácido	Constante de disociación	Referencia
H ₂ CO ₃	$K_{1,C} = \text{Exp} [-2307.1266/T + 2.83655 - 1.5529413 \cdot \log T + (-4.0484/T - 0.20760841) \cdot S^{0.5} + 0.08468345 \cdot S - 0.00654208 \cdot S^{1.5} + \log(1 - 0.001005 \cdot S)]$	Roy et al., 1993.
	$K_{2,C} = \text{Exp} [-3351.6106/T - 9.226508 - 0.2005743 \cdot \log T + (-23.9722/T - 0.106901773) \cdot S^{0.5} + 0.1130822 \cdot S - 0.00846934 \cdot S^{1.5} + \log(1 - 0.001005 \cdot S)]$	
HSO ₄ ⁻	$K_{2,sa} = \text{Exp} [-4276.1/T + 141.328 - 23.093 \cdot \log T + (-1.3856/T + 324.57 - 47.986 \cdot \log T) \cdot I^{0.5} + (35474/T - 771.54 + 114.723 \cdot \log T) \cdot I - (2698 \cdot I^{1.5}/T) + 1776 \cdot I^2/T + \log(1 - 0.001005 \cdot S)]$	Dickson, 1990.
HF	$K_F = \text{Exp} [1590.2/T - 12.641 + 1.525 \cdot I^{0.5} + \log(1 - 0.001005 \cdot S)] + \log(1 + (0.14/96.062) \cdot (S/1.80655)/K_{2,sa})]$	Dickson y Riley, 1979.
B(OH) ₃	$K_B = \text{Exp} [(-8966.90 - 2890.53 \cdot S^{0.5} - 77.942 \cdot S + 1.728 \cdot S^{1.5} - 0.0996 \cdot S^2)/T + (148.0248 + 137.1942 \cdot S^{0.5} + 1.62142 \cdot S) + (-24.4344 - 25.085 \cdot S^{0.5} - 0.2474 \cdot S) \cdot \log T + 0.053105 \cdot S^{0.5} \cdot T]$	Dickson, 1990.
Si(OH) ₄	$K_{si} = \text{Exp} [(-8904.2/T) + 117.385 - 19.334 \cdot \log T + (-458.79/T) + 3.5913] \cdot I^{0.5} + (188.74/T - 1.5998) \cdot I + (-12.1652/T + 0.07871) \cdot I^2 + \log(1 - 0.001005 \cdot S)]$	DOE, 1994.
NH ₃	$K_N = 10^{-9.3}$	Dickson, 1981.
H ₃ PO ₄	$K_{1,P} = \text{Exp} [-4576.752/T + 115.525 - 18.453 \cdot \log T + (-106.736/T + 0.69171) \cdot S^{0.5} + (-0.65643/T - 0.01844) \cdot S]$	DOE, 1994.
	$K_{2,P} = \text{Exp} [-8814.715/T + 172.0883 - 27.927 \cdot \log T + (-160.340/T + 1.3566) \cdot S^{0.5} + (0.37335/T - 0.05778) \cdot S]$	
	$K_{3,P} = \text{Exp} [-3070.75/T - 18.141 + (17.27039/T + 2.81197) \cdot S^{0.5} + (-44.99486/T - 0.09984) \cdot S]$	
H ₂ S	$K_{1,Su} = 10^{\wedge} [(-98.08 + 5765.4/T + (15.0455 \cdot \log T) - (0.157 \cdot S^{0.5}) + (0.135 \cdot S)]$	Giggenbach, 1971.
	$K_{2,Su} = 10^{\wedge} (-17.1)$	
H ₂ O	$K_W = \text{Exp} [-13847.26/T + 148.9652 - 23.6521 \cdot \log T + (118.67/T - 5.977 + 1.0495 \cdot \log T) \cdot S^{0.5} - 0.01615 \cdot S]$	DOE, 1994.

De todas las especies incluidas en la definición del índice “[H⁺]_{TOTAL}”, tienen una especial importancia las distintas especies protolíticas del carbono inorgánico (HCO₃⁻ y CO₂), como puede observarse en la figura 4.16.

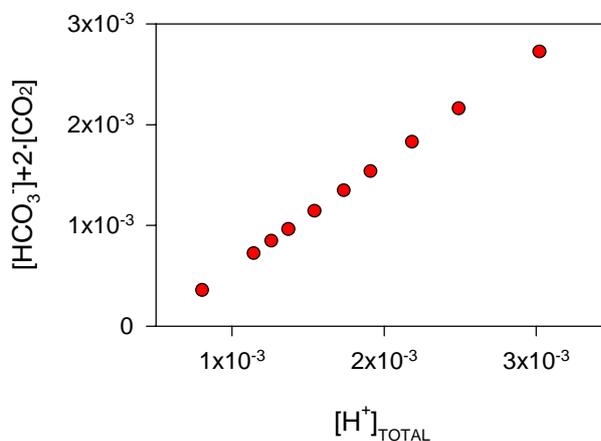


Figura 4.16. Concentración de protones asociada a las especies del sistema del carbono inorgánico frente a la concentración de protones total ([H⁺]_{TOTAL}) en SIES 12.

Una vez calculada, tanque a tanque, la [H⁺]_{TOTAL}, puede usarse esta magnitud como índice conservativo de mezcla para caracterizar la reactividad del fosfato en SIES 10, 11 y 12. Así, en la figura 4.17., se muestra la variación de la concentración de fosfato disuelto frente a la concentración de protones totales en estos tres experimentos.

En dicha figura se observa que, en los tres casos, la variación de la concentración de fosfato disuelto frente a la concentración total de protones se puede ajustar con bastante exactitud a una línea recta (ver los resultados de los ajustes lineales). Esto indica que, para los tres valores de salinidad simulados en SIES 10, 11 y 12, el fosfato disuelto describe un comportamiento conservativo para los intervalos de variación de pH ensayados.

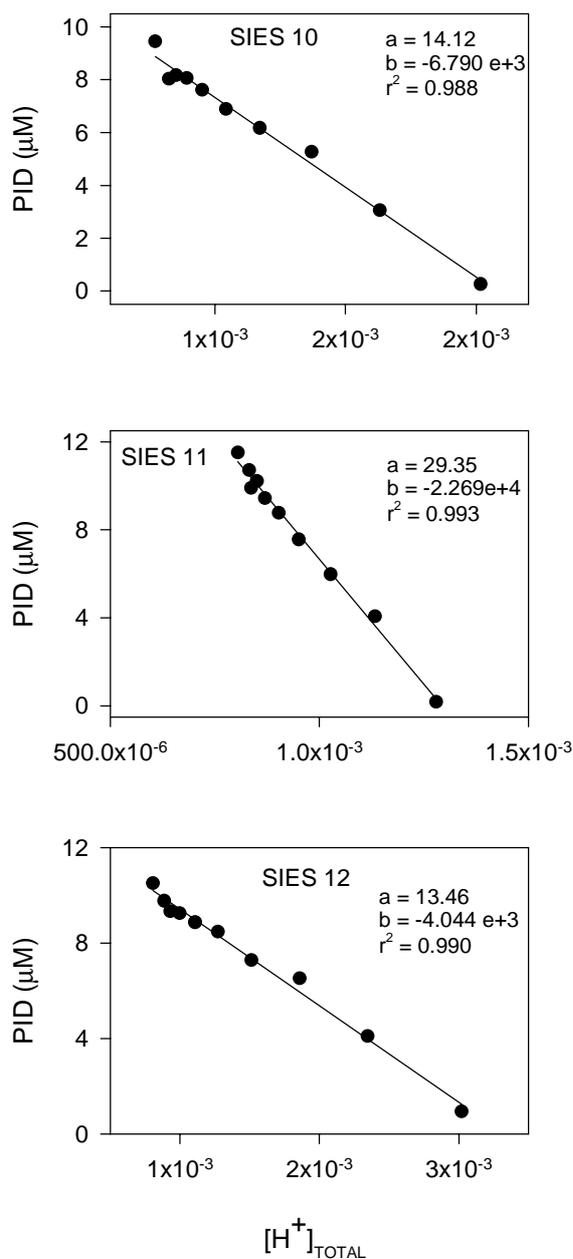


Figura 4.17. Variación de la concentración de fosfato disuelto (PID) frente a la concentración de protones totales en los experimentos SIES 10, 11 y 12.

Este comportamiento conservativo está refrendado por los valores tan reducidos que presenta el fósforo particulado tanque a tanque (cerca de cero) y la variación *cuasi* nula de su concentración a lo largo del simulador. A modo de ejemplo, en la figura 4.18, se presentan de forma conjunta las concentraciones de fosfato disuelto y fósforo particulado frente a la variación de pH (NBS) en SIES 10.

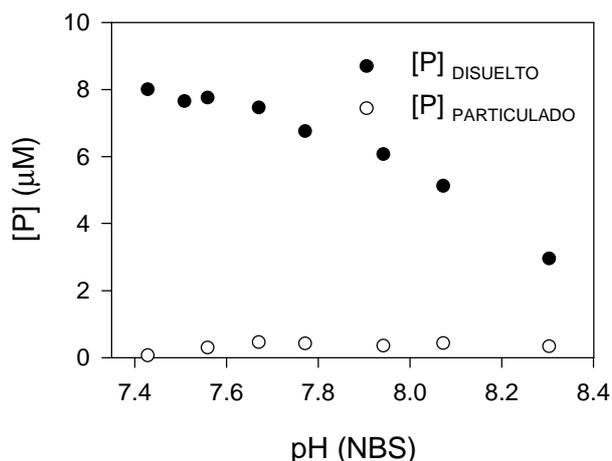


Figura 4.18. Variación de la concentración de fosfato disuelto y particulado frente al gradiente de pH generado en SIES 10.

De hecho, si se calcula la reactividad real de fosfato, se obtienen unos valores muy bajos de la misma a lo largo de todo el gradiente de pH, lo que constata el comportamiento conservativo que se observa en los tres ensayos. Dichos valores de reactividad real se han calculado como sigue:

$$R(\%) = \left(\frac{[P]_{\text{PARTIC}}}{[P]_{\text{TOTAL}}} \right) \cdot 100$$

Por ejemplo, en SIES 10, los valores de reactividad real oscilan entre 0.83% y 10.1%, lo que indica una reactividad muy baja y relativamente constante a lo largo de todo el simulador.

El hecho de que la reactividad permanezca relativamente constante en este experimento puede interpretarse fácilmente si se considera que la principal especie que tiende a formarse es el hidroxapatito. En este sentido, y puesto que la adición de protones y fosfato se realiza por la misma parte del simulador, existirá una variación contraria de la concentración de fosfato y de iones OH^- , que tenderían a mantener relativamente constante el índice de saturación de este mineral.

Si se simularan intervalos de variación de concentración de fosfato disuelto más amplios y gradientes de pH más acusados, los cambios en la reactividad de este compuesto se harían mucho más patentes y sería más fácil establecer tendencias. El problema es que tales simulaciones no serían representativas de los valores ambientales de pH y

concentración de fosfato. En las simulaciones que se presentan en esta Memoria, se ha preferido trabajar con valores lo más reales posibles, de ahí que, a veces, sea ciertamente difícil dilucidar tendencias claras.

4.4. BIBLIOGRAFÍA

Allison, J.D., Brown, D.S., Novo-Gradac, K.J. 1991. MINTEQA2/PRODEFA2: A geochemical assessment model for environmental systems: version 3.0 user's manual. U.S. EPA, Environmental Research Laboratory. EPA/600/3-91/021. 116 pp.

Aston, S.R. 1980. Nutrients, dissolved gases and general biogeochemistry in estuaries. En: Chemistry and Biogeochemistry of Estuaries, Olausson, E. and Cato, I., Eds. John Wiley and Sons. Chichester. Pág.: 233.

Bale, A.J. y Morris, A.W. 1981. Laboratory simulation of chemical processes induced by estuarine mixing: the behaviour of iron and phosphate in estuaries. *Estuarine Coastal Shelf Sci.*, 13:1-10.

Balls, P. W. 1994. Nutrient Inputs to Estuaries from Nine Scottish East Coast Rivers: Influence of Estuarine Processes on Inputs to the North Sea. *Estuarine Coastal Shelf Sci*, 39: 329-352.

Barbanti, A., Bergamini, M. C., Frascari, F., Miserocchi, S., Ratta, M., Rosso, G. 1995. Diagenetic processes and nutrient fluxes at the sediment-water interface, Northern Adriatic Sea, Italy. *Mar. Freshwater Res.*, 46: 55-67.

Bates, R.G. 1973. Determination of pH, Theory and Practice. Wiley, New York, NY, 2ª ed., 479 pp.

Bates, R.G., Macaskill, J.B. 1975. Acid-base measurement in seawater. En: Analytical Methods in Oceanography, Advances in Chemistry Series 147. Am. Chem. Soc. (T.P.R. Gibb, Jr, Ed.). Washington, pp: 110-123.

Bates, R.G., Culberson, H. 1977. Hydrogen ions and the thermodynamic state of marine systems, En: The fate of fossil fuel CO₂ in the oceans (N.R. Andersen y A. Malahoff, Eds.). Plenum, pp: 45-61.

Bates, R.G., Calais, G. 1981. Thermodynamics of the dissociation of BisH⁺ in seawater from 5 to 40°C. *J. Solut. Chem.*, 10: 269-279.

Benoit, G., Otkay-Marshall, A., Cantu, A., Hood, E.M., Coleman, C.H., Corapcioglu, M.O., Santschi, P.H. 1994. Partitioning of Cu, Pb, Ag, Zn, Fe, Al y Mn between filter-retained particles, colloids, and solution in six Texas estuaries. *Mar Chem*, 45: 307-336.

Berner, R.A., Ruttenberg, K.C., Ingall, E.D., Rao, J.L. 1993. The nature of Phosphorus burial in modern marine sediments. En: Interactions of C, N, P and S biogeochemical cycles and global changes. Wollast, R., McKenzie, F.T. y Chou, L. (Eds.). NATO Asi Series. Springer Verlag, Berlin. pp: 365-378.

Biggs, R.B., Howell, B.A. 1984. The estuary as a sediment trap: alternate approaches to estimating its filtering efficiency. En: The estuary as a filter. Kennedy, V.S. (Ed.). Academic Press, New York. pp: 107-129.

Burns, P.A., Salomon, M. 1969. Phosphate adsorption by kaolin in saline environments. *Proc Nat Shellfish Ass*, 59: 121-125.

Burton, J.D., Liss, P.S., Venugopalan, V.K. 1970. The behaviour of dissolved silicon during estuarine mixing. En: Estuarine Chemistry. (J.D. Burton, y P.S. Liss, eds.). Academic Press, London. pp: 93-130.

Caraco, N.F. 1990. Relationship between production and nutrient loading in a brackish coastal pond, Siders pond, Falmouth, Massachusetts. En: Woods Hole Oceanographic Institution Technical Report. Giblin, A.E. (Ed.). pp: 8-12.

Carpenter, J.H., Pritchard, D.W., Whaley, R.C. 1969. Observations of eutrophication and nutrient cycles in some coastal plain estuaries. En: Eutrophication: Causes, Consequences and Correctives. National Academy of Sciences, Washington D.C. Pág.: 210.

Carrit, D.E., Goodgal, S. 1954. Sorption reactions and some ecological implications. *Deep-Sea Res*, 1: 224-243.

Chen, Y.S.R., Butler, J.N., Stumm, W. 1973. Kinetic study of phosphate reaction with aluminium oxide and kaolinite. *Environ Sci Technol*, 7: 327-332.

Conley, D.J., Smith, P.L., Cornwell, E.A., Fisher, A.L. 1995. Transformation on particle-bound Phosphorus at the land-sea interface. *Estuarine Coastal Shelf Sci.*, 40: 161-176.

Clark, J.F., Simpson, H.J., Bopp, R.F., Deck, B. 1991. Geochemistry and Loading History of Phosphate and Silicate in the Hudson Estuary. *Estuarine Coastal Shelf Sci.*, 34: 213-233.

Covington, A.K., Bates, R.G., Durst, R.A. 1985. Definition of pH scales, standard reference values, measurement of pH and related terminology. *Pure Appl. Chem.*, 57: 531-542.

Culberson C.H. 1981. Direct Potentiometry. En: *Marine Electrochemistry* (Whilfield, M. y Jagner, J., Eds.). John Wiley and Sons Ltd. Boca Ratón, Florida, pp: 187-261.

Day, J.H. 1981. The chemistry and fertility of estuaries. En: *Estuaries Ecology*. Day, J.H. Ed. A.A. Balkema. Rotterdam. Pág.: 57.

De Jonge, V.N., Villerius, L.A. 1989. Possible role of carbonate dissolution in estuarine phosphate dynamics. *Limnol Oceanogr*, 34 (2): 332-340.

Dickson, A.G., Riley, J.P. 1979. The estimation of acid dissociation constants in seawater media from potentiometric titrations with strong base.I. The ionic product of water (K_W). *Mar. Chem.*, 7: 89-99.

Dickson, A.G. 1984. pH scales and and proton-transfer reactions in saline media such as sea water. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 48: 2299-2308.

Dickson, A.G., Millero, F.J. 1987. A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep-Sea Res.*, 34(10): 1733-1743.

Dickson, A.G. 1993. pH buffers for sea water media based on the total hydrogen ion concentration scale. *Deep-Sea Res. I*, 40: 107-118.

DOE, 1994. Handbook of methods for the analysis of the varius parameters of the carbon dioxide system in sea water; version 2, A. G. Dickson & C. Goyet, eds. ORNL/CDIAC-74.

Doering, P.H., Oviatt, C.A., Nowicki, B.L., Klos, E.G., Reed, L.W. 1995. Phosphorus and Nitrogen limitation of primary production and a simulated estuarine gradient. *Marine Ecology Progress Series*, 124: 271-287.

Dunstan, W.M., Atkinson, L.P. 1976. Sources of new nitrogen for the South Atlantic Bight. En: *Estuarine Processes* (1). Wiley, M. (Ed.). Academic Press. New York. Pág.: 69-78.

Fang, T.H. 2000. Partitioning and behaviour of different forms of Phosphorus in the Tanshui estuary and one of its tributaries, North Taiwan. *Estuarine Coastal Shelf Sci*, 50: 689-701.

- Flegal, A.R., Smith, G.J., Gill, G.A. 1991. Dissolved trace element cycles in the San Francisco Bay estuary. *Mar Chem*, 36: 329-363.
- Forsgren, G., Jansson, M., Nilsson, P. 1998. Aggregation and sedimentation of Iron, Phosphorus and Organic Carbon in experimental mixtures of freshwater and estuarine water. *Estuarine Coastal Shelf Sci*, 43 (2): 259-268.
- Fox, L.E. 1989. A model for inorganic control of phosphate concentration in river waters. *Geochim et Cosmochim Acta*, 53: 417-428.
- Fox, L.E. 1990. Geochemistry of dissolved phosphate in the Sepik river and estuary, Papua, New Guinea. *Geochim et Cosmochim Acta*, 54: 1019-1024.
- Froelich, P.N. 1988. Kinetic control of dissolved phosphate in natural rivers and estuaries: A primer on the phosphate buffer mechanism. *Limnol Oceanogr*, 33 (4): 649-688.
- Gaudette, H. E., Lyons, W. B. 1980. Phosphate geochemistry in nearshore carbonate sediments a suggestion of apatite foormation. *SEPM Special Publication*, 29: 215-225.
- Giordani, P., Hammond, D. E. 1985. Techniques for measuring benthic fluxes of ^{222}Rn and nutrients in coastal waters. Consiglio Nazionale delle Ricerche Istituto per la Geologia Marina. Bologna, Rapporto Tecnico N. 20: 1-33.
- Golterman, H.L. 1988. The calcium and iron bound phosphate phase diagram. *Hydrobiologia*, 159: 149-151.
- Golterman, H.L. 1998. The distribution of phosphate over iron-bound and calcium-bound phosphate in stratified sediments. *Hydrobiologia*, 364: 75-81.
- Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K. 1983. Methods of Seawater Analysis. Verlag Chemie, R.F.A.
- Gunnars, A., Blomqvist, S. 1997. Phosphate exchange across the sediment-water interface when shifting anoxic to oxic condictiones - an experimental comparison of freshwater and brackish-marine systems. *Biogeochem.*, 37: 203-226.
- Haines, E.B. 1979. Growth dynamics of cordgrass, *Spartina alterniflora*, on control and sewage sludge fertilized plots in a Georgia salt marsh. *Estuaries*, 2: 50.

Hanson, I. 1973. A new set of acidity constants for carbonic acid and boric acid in sea water. *Deep-Sea Res.*, 20: 461- 478.

Hobbie, J.E., Copeland, B.J., Harrison, W.G. 1975. Sources and fates of nutrients of the Pamlico river Estuary, North Carolina. En: Cronin, L.E. (Ed.). *Estuarine Research* (1). Academic Press, New York. pp: 287-302.

Hobbie, J.E. 1976. Nutrients in estuaries. *Oceanus*, 19: 41.

Jahnke, R.A. 2000. The Phosphorus cycle. *Earth System Science*. pp: 360-376.

Jaworski, N.A. 1981. Sources of nutrients and the scale of eutrophication problems in estuaries. En: *Estuaries and Nutrients*. Neilson, B.J. and Cronin, L.E., eds. Humana Press, Clifton, N.J. Pág.: 83.

Kester, D.R., Pytkowicz, R.M. 1967. Determination of the apparent dissociation constants of phosphoric acid in sea water. *Limnol Oceanogr* 12: 243-252.

Khoo, K.H., Ramette, R.N., Culberson, C.H., Bates, R.G. 1977. Determination of hydrogen ion concentrations in seawater from 5 to 40°C: Standard potentials at salinities from 20 to 45 ‰. *Anal. Chem.*, 49: 29-34.

Klotz, I.M., Rosenberg, R.M. 1977. *Termodinámica Química*. Editorial AC, Madrid, 421 pp.

Kobayashi, J. 1967. Silica in fresh waters and estuaries. En: *Chemical environment in the aquatic habitat*. Golterman, H.L. y Clymo, R.S., Eds. Amsterdam. Pág: 41-55.

Lebo, Martin E. 1991. Particle-bound phosphorus along an urbanized coastal plain estuary. *Mar Chem*, 34: 225-246.

Lebo, Martin E., Sharp, J.H. 1992. Modeling phosphorus cycling in a well-mixed coastal Plain Estuary. *Estuarine Coastal Shelf Sci*, 35: 235-252.

Lebo, Martin E., Sharp, J.H., Cifuentes, L.A. 1994. Contribution of River Phosphate Variations to Apparent Reactivity Estimated from Phosphate-Salinity Diagrams. *Estuarine Coastal Shelf Sci*, 39: 583-594.

Levinton, J.S. 1982. *Marine Ecology*. Prentice-Hall. Englewood Cliffs, N.J.

Lippson, A.J., Haire, M.S., Holland, A.F., Jacobs, F., Jensen, J., Moran-Johnson, R.L., Polgar, T.T., Richkus, W.A. 1981. Environmental Atlas of the Potomac Estuary. The Johns Hopkins University Press. Baltimore.

Lucotte, M., d'Anglejan, B. 1985. A comparison of several methods for the determination of iron hydroxides and associated orthophosphates in estuarine particulate matter. *Chem Geol*, 48: 257-264.

Mackay, D.W., Leatherland, T.M. 1976. Chemical processes in an estuary receiving major inputs of industrial and domestic wastes. En: Estuarine Chemistry. Burton, J.D. y Liss, P.S., Eds. Academic Press. Londres. Pág: 185-218.

Matisoff, G., Fisher, J. B., McCall, P. L. 1981. Kinetics of nutrient and metal release from decomposing lake sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 45: 2333-2347.

Mehrbach, C., Culberson, C.H., Hawley, J.E., Pytkowicz, R.M. 1973. Measurement of the apparent dissociation constant of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure. *Limnol. Oceanogr.*, 18: 897-907.

Millero, F.J. 1983. The estimation of the pK_{HA}^* of acids in seawater using the Pitzer equations. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 47: 2121-2129.

Millero, F.J. 1986. The pH of estuarine waters. *Limnol. Oceanogr.*, 31: 839-847.

Millero, F.J., Sohn, M.L. (eds.). 1992. En Chemical Oceanography. CRC Press, Boca Raton (USA). pp: 59-114.

Millward, G.E., Turner, A. 1995. Trace metal in estuaries. En: Trace elements in natural waters (eds. Salbu, B., Steinnes, E.) CRC Press; Boca Raton; Florida. Cap.10: 223-245.

Mook, W.G., Koene, B.K.S. 1975. Chemistry of dissolved inorganic carbon in estuarine and coastal brackish waters. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 3: 325-336.

Nixon, S.W. 1981. Remineralization and nutrient cycling in coastal marine ecosystems. En: Estuaries and Nutrients. Neilson, B.J. and Cronin, L.E., eds. Humana Press, Clifton, N.J. Pág.: 111.

Nixon, S.W. 1987. Chesapeake Bay nutrient budgets –a reassessment. *Biogeochem.*, 4: 77-90.

Nowicki, B.L., Oviatt, C.A. 1990. Are estuaries traps for anthropogenic nutrients? Evidence from estuarine mesocosms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 66: 131-146.

Nriagu, J.O., Moore, P.B (eds) 1984. Phosphate Minerals. Springer-Verlag, Berlín. 442 pp.

Odum, E.P. 1971. Fundamentals of Ecology. W.B. Saunders Co, Philadelphia.

Officer, C.B. 1979. Discussion of the behaviour of nonconservative dissolved constituents in estuaries. *Estuarine Coastal Shelf Sci*, 9: 91-94.

Ortega, T. 2001. Flujos de Carbono Inorgánico en sistemas costeros de la Península Ibérica. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz, 390 pp.

Pitkänen, H., Tamminen, T. 1995. Nitrogen and phosphorus production limiting factors in the estuarine waters of the eastern Gulf of Finland. *Marine Ecology Progress Series*, 129:283-294.

Pitzer, K.S. 1991. Activity coefficients in electrolyte solutions. CRC Press, Boca ratón, Florida. 542 pp.

Pomeroy, L.R., Smith, E.E., Grant, C.M. 1965. The exchange of phosphate between estuarine water and sediments. *Limnol Oceanogr*, 10: 167-172.

Pomeroy, L.R., Wiegert, R.G. (eds) 1981. The ecology of a salt marsh. Ecological Studies (38). Springer Verlag, New York.

Prastka, K., Sanders, R., Jickells, J. 1998. Has the role of estuaries as sources or sinks of dissolved inorganic phosphorus changed over time? Results of a K_D study. *Mar Poll Bull*, 36 (9): 718-728.

Romankevich, E.A. 1984. Geochemistry of organic matter in the ocean. Springer Verlag, Berlin. 334 pp.

Rossi, G., Premazzi, G. 1991. Delay in lake recovery-caused by internal loading. *Wat Res*, 25(5): 567-575.

Ruttenberg, K.C., Berner, R.A. 1993. Authigenic apatite formation and burial in sediments from non-upwelling, continental margin environments. *Geochim et Cosmochim Acta*, 57: 991-1007.

Ryther, J.H., Dunstan, W.M. 1971. Nitrogen, phosphorus and eutrophication in the coastal marine environment. *Science*, 171: 1008.

Shengquan, G., Guohui, Yuhen, W. 1993. Distributinal features and fluxes of dissolved nitrogen, phosphorus and silicon in the Hangzhou Bay. *Mar Chem*, 43: 65-82

Stefánsson, U., Richards, F.A. 1963. Processes contributing to the nutrient distributions of the Columbia River and Strait of the Juan de Fuca. *Limnol. Oceanogr.*, 8: 394-410.

Stommel, H. 1953. Computation of pollution in a vertically mixed estuary. *Sewage Ind. Wastes*, 25: 1065-1071.

Tanaka, K. 1995. Runoff loadings and chemical forms of soil Phosphorus from rivers in Japon during the high flow stages. *JARQ*, 29: 223-229.

UNESCO, 1987. Thermodynamics of the carbon dioxide system in seawater. Report by the carbon dioxide subpanel of the joint panel on oceanographic tables and standards. Unesco Technical Papers in Marine Science, 51. Paris.

Van Alsenoy, V., Van Put, A., Bernard, P., Van Grieken, R. 1989. Chemical characterization of suspension and sediments in the north sea and the Scheldt estuary. G. Pichot (editor). *Progress in Belgium Oceanographic Research*. Royal Academy of Sciences, Brussels: 351-368.

Van Beusekom, J.E.E., De Jonge, V.N. 1997. Transformation of Phosphorus in the Wadden Sea: Apatite formation. *German Journal of Hidrography*, 49 (2/3): 297-305.

Van Beusekom, J.E.E., Brockmann, U.H. 1998a. Transformation of Phosphorus in the Elbe estuary. *Estuaries*, 21 (4A): 518-526.

Van Beusekom, J.E.E., De Jonge, V.N. 1998b. Retention of Phosphorus and Nitrogen in the Ems Estuary. *Estuaries*, 21 (4A): 527-539.

Vaithyanathan, P., Jha, P.K., Subramanian, V. 1993. Phosphorus distribution in the sediments of the Hooghly (Ganges) estuary (India). *Estuarine Coastal Shelf Sci.*, 37, 603-614.

Webb, K.L. 1981. Conceptual models and processes of nutrient cycling in estuaries. En: Estuaries and Nutrients. Neilson, B.J. and Cronin, L.E., eds. Humana Press, Clifton, N.J. Pág: 25.

Whitfield, M., Butler, R.A., Covington, A.K. 1985. The determination of pH in estuarine waters. I. Definition of pH scales and selection of buffers. *Oceanol., Acta*, 8: 423-432.

Windom, H.L., Dunstan, W.M., Gardner, W.S. 1975. River input of inorganic phosphorus and nitrogen to the southeastern salt marsh estuarine environment. En: Mineral cycling in southeastern ecosystems. U.S. Energy Research and Development Administration Symposium Series, CONF-740513. Washington D.C. Pág.: 309.

Wollast, R. 1973. Origine et mecanisme de l'envasement de l'estuarie de l'Escant. Internal Report, Institut de Chimie Industrielle. Université Libre de Bruxelles.

Wood, T.M., Baptista, A.M., Kubawara, J.S., Flegal, A.R. 1995. Diagnostic modeling of trace metal partitioning in south San Francisco Bay. *Limnol. Oceanogr.*, 40(2): 345-358.

**5. COMPORTAMIENTO DE METALES PESADOS
EN EL ESTUARIO DEL GUADALQUIVIR TRAS
EL ACCIDENTE DE AZNALCÓLLAR**

5.1. INTRODUCCIÓN

La rotura el 25 de abril de 1998 de la balsa de residuos mineros de la empresa Bolidem-Apirsa supuso uno de los episodios de contaminación aguda más importante que ha sufrido el entorno de Doñana de los que se tiene conocimiento. Este accidente provocó el vertido al medio de cinco millones de metros cúbicos de lodos procedentes de los residuos de la flotación de piratas y aguas ácidas de mina que contenían concentraciones muy elevadas de metales pesados (principalmente Fe, Zn, Pb, Cu, Sb, Tl, Cd, Hg) y otros elementos y compuestos de una elevada toxicidad.

El vertido se produjo en forma de una riada al río Agrio y a través de él pasó al Guadiamar que es, a su vez, tributario del río Guadalquivir a 24 Km de su desembocadura (figura 5.1.). Esta riada anegó unas 4.280 Ha de terrenos agrícolas y de marisma próximos al Parque Nacional de Doñana y fue contenida construyendo de manera improvisada unos muros de contención en la zona del brazo de La Torre conocida como Entremuros, una canalización del tramo final del río Guadiamar, apenas a 16 Km del Guadalquivir. A este último río accedió sólo una parte no cuantificada, aunque presumiblemente importante, de los contaminantes liberados (Grimalt et al., 1999).

En los días siguientes al suceso las Administraciones competentes en temas ambientales de la Junta de Andalucía y del Gobierno Central iniciaron diversas actuaciones para conocer la dimensión del daño producido y establecer las posibles medidas remediadoras.

Una de las cuestiones en las que hubo un amplio consenso fue la necesidad de retirar de manera rápida y cuidadosa los lodos de los terrenos afectados, tratando de minimizar la exposición a ellos de personas y animales y evitando su dispersión atmosférica. Por el contrario, la eliminación de la zona de Entremuros de los casi 3.6 millones y medio de metros cúbicos de aguas ácidas de mina planteó una cierta polémica. Existían dos opciones contrarias y excluyentes: liberar de manera regulada el volumen almacenado al río Guadalquivir o proceder a su depuración con anterioridad al vertido.

La primera de las alternativas estaba fundamentada en la necesidad de retirar los lodos contenidos en el cauce del Guadiamar antes de que llegaran las lluvias de otoño, que circunstancialmente pueden ser muy intensas en la zona. Esto implicaba la necesidad de desecar el cauce con la mayor rapidez posible. Podía argumentarse que regulando

adecuadamente la tasa de vertido de las aguas tóxicas, eligiendo las mareas de alto coeficiente y aumentando el caudal del Guadalquivir, que está regulado por diversos embalses, el impacto que se causaría en el estuario y en su zona de influencia podía ser asumible.

La segunda opción, que fue la adoptada, era la más indicada desde un punto de vista ambiental aunque implicaba un cierto riesgo, ya que era necesario construir una depuradora de gran capacidad para el tratamiento de las aguas tóxicas. Esto requería tiempo y era necesario, además, realizar una fuerte inversión para una actuación de remediación de carácter puntual.

En la elección influyó, sin duda, el marco geográfico en el que se produjo el accidente minero, ya que a pocos kilómetros se encuentra el Parque Nacional de Doñana que está considerado como Reserva de la Biosfera y Patrimonio de la Humanidad. Sus distintos ecosistemas, que se extienden sobre más de cien mil hectáreas, albergan 803 especies de fanerógamas, algunas de ellas endémicas, y una fauna de vertebrados compuesta por 37 especies de peces, 12 de anfibios, 19 de reptiles y 29 de mamíferos. Su avifauna es emblemática ya que agrupa a 361 especies, el 70% de las existentes en Europa. La mayor parte de ellas son acuáticas, tanto de invernada como nidificantes, que en años favorables pueden mantener una población superior a los 700.000 ejemplares (Grimalt et al., 1999). Muchos de los animales presentes pertenecen a especies amenazadas y algunas de ellas encuentran en Doñana su más destacado reducto europeo. Todos los ecosistemas presentes en el Parque están sustentados por la productividad de las zonas de marisma que aunque son muy fluctuantes, en función de las condiciones meteorológicas, representan la mayor parte de su extensión. Estas marismas conforman terrenos de cota baja y parte de ellas pueden ser ocasionalmente afectadas por las crecidas del Guadalquivir.

Además, en el entorno de Doñana existe una elevada variedad de usos del territorio, entre los que cabe destacar la actividad pesquera y marisquera, la acuicultura, el cultivo de arroz y el uso turístico que posee gran parte de la zona. El mantenimiento de todas estas actividades, que tienen una gran trascendencia socioeconómica, está supeditado a la existencia de una elevada calidad en las aguas de la zona.

La construcción de la depuradora y el tratamiento posterior del agua tóxica retenida en Entremuros finalizó en los últimos días de agosto de 1998 y puede afirmarse que el impacto causado en el medio físico del estuario del Guadalquivir por el vertido del agua

depurada ha sido bajo (Gómez-Parra et al., 2000). A pesar de ello pudieran subsistir todavía dudas sobre la idoneidad de la decisión adoptada en su día sobre la depuración previa al vertido, cuyo costo ha superado ampliamente los mil millones de pesetas.

La elección entre dos alternativas, que eran excluyentes, impide comparar los efectos que hubiesen tenido ambas, toda vez que obviamente ya no puede realizarse el vertido del agua tóxica sin depurar. En ese sentido la conveniencia de la actuación realizada puede ser siempre cuestionada.

El trabajo que se resume en este capítulo ha tenido por objeto determinar el efecto que hubiera producido en el estuario del Guadalquivir y en la zona oceánica próxima el vertido sin depurar del agua tóxica retenida en Entremuros, utilizando para ello una simulación del proceso de mezcla de cuerpos de agua que tiene lugar en el bajo Guadalquivir. La simulación se ha realizado manteniendo el gradiente de salinidad en régimen estacionario y añadiendo al simulador el agua tóxica de manera continua. De esta manera, los resultados obtenidos pueden representar la situación promedio que se hubiera detectado en el estuario del Guadalquivir en el caso de haber realizado el vertido de las aguas ácidas de mina como se indicó en el Capítulo 1 de esta Memoria.

Por otra parte, aprovechando que se realizó una caracterización suficiente de las masas de agua de río y de mar con las que se simuló la mezcla estuárica, se utilizó un modelo propuesto por Turner et al. (1981) para estimar la especiación de los metales analizados a lo largo del gradiente de salinidad del estuario del Guadalquivir.

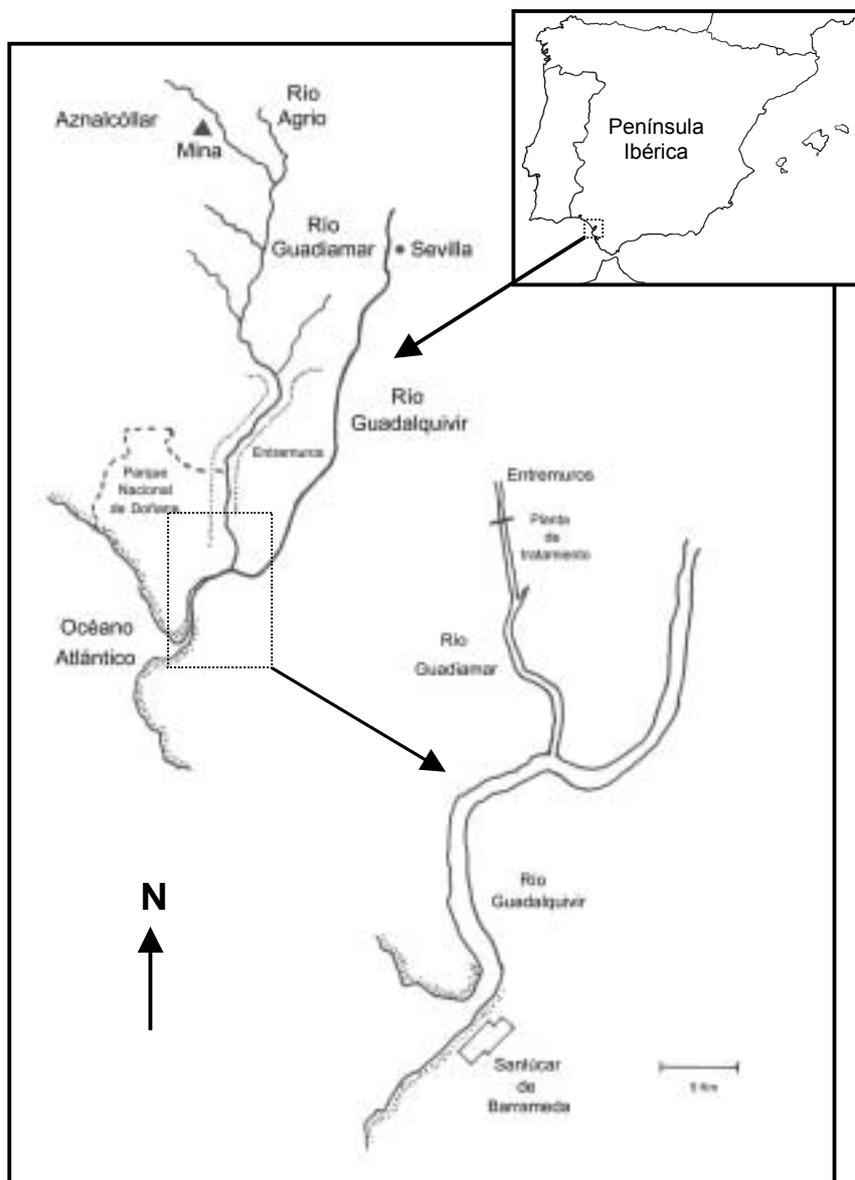


Figura 5.1. Localización geográfica del accidente minero de Aznalcóllar (modificado de Gómez-Parra et al., 2000)

5.2. MATERIAL Y MÉTODOS

5.2.1. Métodos Analíticos

Determinación de metales

La determinación de metales (Cd, Cu, Pb y Zn), se realizó por Voltamperometría de Redisolución Anódica, utilizando un equipo Metrohm VA 646 con Stand VA 647. El electrodo de trabajo (Metrohm, 6.1246.020), sobre el cual se amalgaman los metales preconcentrándose desde la disolución, se utilizó en el modo HMDE (Electrodo de gota de mercurio colgante). Se empleó un electrodo de Ag/ AgCl, KCl (3M) (Metrohm 6.0726.100) como electrodo de referencia y uno de Pt (Metrohm 6.0412.100) como electrodo auxiliar.

El método seguido para la determinación de metales fue descrito por Ponce (1996):

- El tiempo de purga y agitación inicial fue de 500 s y, entre adiciones, de 20 s.
- El tiempo de preconcentración fue de 300 s y se realiza a un potencial de -1.1 v.
- Se empleó un tiempo de reposo de 10 s.
- La modulación de la onda durante el barrido de potencial se realizó en modo de pulso diferencial (DP), con una amplitud del impulso de 30 mV y una periodicidad de 0.30 s. El barrido se efectuó entre -1075 y 50 mV a una velocidad de 13.33 mV/s y con un incremento de potencial entre impulsos de 4 mV en sentido anódico.
- Se utilizó un tiempo de medida de 30 ms, mientras que el tiempo de impulso fue de 40 ms.

En todos los casos, se tomaron 10 mL de muestra a los que se añadieron 2mL de una disolución tampón relativamente concentrada de NaAc (1.73 M) en KCl (1 M), que ajusta el pH a un valor de 4.6.

Para la determinación de metales en *fase disuelta*, las muestras se filtraron a vacío empleando filtros de fibra de vidrio (Millipore AP40-057-05). Las muestras, una vez filtradas, se sometieron a digestión ultravioleta durante 4 horas (previa adición de 200 μ L de H₂O₂ al 30%) en un digestor 705 UV de Metrohm (con lámpara de 500 W) con el fin de eliminar la materia orgánica.

Para la determinación de metales en *fase particulada*, las muestras se filtran a vacío empleando filtros de policarbonato (Millipore HTTP 04700) de 0.4 μm . Posteriormente, los filtros se liofilizan durante 48 horas y se digieren en bombas de teflón siguiendo la metodología descrita por Loring y Rantala (1992). Tras añadir a los filtros 2 mL de Agua Regia (HCl y HNO₃ en proporción 3 a 1) y 2 mL de HF, las bombas se mantienen en el microondas 70 s a 700 W y, tras enfriarlas, se pasa el contenido a un matraz aforado de polipropileno de 50 mL. Se lavan las bombas con una disolución de ácido bórico, con el que también se enrasan los matraces. Todos los reactivos empleados en este protocolo fueron de categoría *Suprapur*. Se ha verificado el método analítico mediante el empleo de material de referencia (MESS-1NRC y CRM 277 BCR). En todos los casos los análisis concordaron con los valores certificados en un porcentaje superior al 90%.

La cuantificación de metales se llevó a cabo mediante el método de las adiciones estándar. Para ello, se realizaron dos adiciones de 50 μL de una disolución patrón de 40 ppm de Zn, 0.2 ppm de Cd, 1 ppm de Pb y 2 ppm de Cu, por medio de una bureta automática (Dosimats 685, Metrohm). Las señales correspondientes tanto a las muestras como a las adiciones se obtuvieron por duplicado efectuando barridos independientes. La concentración de cada metal se calculó por medio de una regresión lineal de las cantidades añadidas y las señales a que daban lugar.

5.2.2. Ensayos realizados

En relación con el accidente minero de Aznalcóllar, se han realizado tres experimentos, concretamente los denominados SIES 1, SIES 2 y SIES 3. El objetivo principal de estos tres ensayos fue el simular, en un estuario, los efectos de un evento de contaminación aguda por metales pesados.

De forma previa a los ensayos de simulación, se determinaron los gradientes longitudinales de salinidad reales en la zona comprendida entre la desembocadura del Guadalquivir y su confluencia con el río Guadiamar (Sáenz, 1999; Gómez-Parra et al. 2000) comparándolos posteriormente con los gradientes de salinidad que se utilizaron en cada uno de los experimentos.

A la vista de los resultados, se aprecia que el primer ensayo de simulación (SIES 1) corresponde a una situación intermedia de marea, por tanto, es el ensayo más representativo de las condiciones hidrodinámicas de la zona. Por esta razón, gran parte

de la discusión del comportamiento de los metales corresponde a los resultados obtenidos para esta situación. El segundo ensayo (SIES 2) describe una situación de bajamar típica, donde el volumen de agua del estuario es menor, y la influencia del vertido de metales sobre el sistema debería ser *a priori* más intensa. Por último, en el tercer ensayo (SIES 3), se ha realizado una ampliación de la zona fluvial del estuario, ya que la mayor reactividad de las sustancias se produce precisamente a bajas salinidades. De esta forma, se pueden estudiar más detalladamente los procesos físico-químicos que tienen lugar en dicha zona.

Los gradientes de salinidad se generaron a partir del simulador lleno de agua de mar en el primer ensayo y de agua de río en los dos restantes. En la figura 5.2. se muestra, a modo de ejemplo, la variación que experimentó con el tiempo el gradiente de salinidad para SIES 1. Se observa que, pasadas las primeras 84 horas (3.5 días), el perfil de salinidades permanece en estado estacionario (el gradiente experimental coincide con el teórico). No obstante, los muestreos se realizaron en torno a ocho días después del comienzo de los ensayos (SIES 1 y 2) y once días en el caso de SIES 3. En este momento, el grado de concordancia entre la salinidad de los distintos tanques y los valores teóricos previstos *a priori* fue excelente.

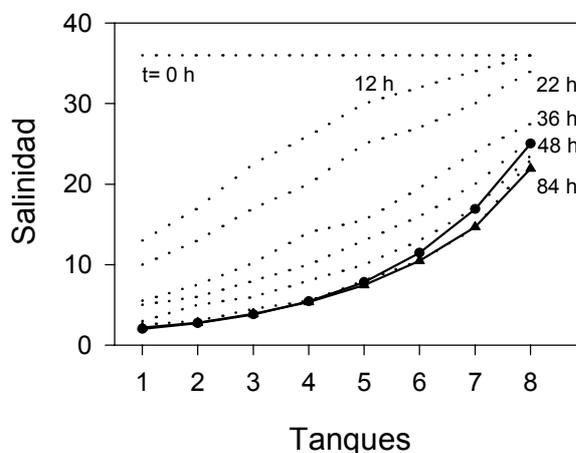


Figura 5.2. Estabilización del gradiente de salinidad desde el comienzo del experimento SIES 1. En trazo discontinuo se señalan los sucesivos gradientes experimentales y, en trazo continuo, el gradiente teórico una vez alcanzado el estado estacionario.

No obstante, el diseño y las características de estos tres experimentos han sido detallados prolijamente en el apartado 2.4. del Capítulo 2.

5.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3.1. Aplicabilidad de la simulación al estuario del Guadalquivir

Ya que el equipo de simulación no está diseñado para establecer un gradiente vertical de salinidad en cada uno de los tanques, se ha determinado el grado de homogeneidad vertical que existe en el estuario del Guadalquivir. En la figura 5.3. se muestran los perfiles verticales de salinidad obtenidos *in situ* en diferentes estaciones de la zona estuárica del Guadalquivir. Puede observarse cómo las variaciones con la profundidad son poco importantes y, en este sentido, el sistema puede considerarse como un estuario no estratificado (estuario tipo A de la clasificación de Beer, 1983). De esta manera, los resultados obtenidos permiten la aplicación del equipo de simulación al estudio del estuario del Guadalquivir.

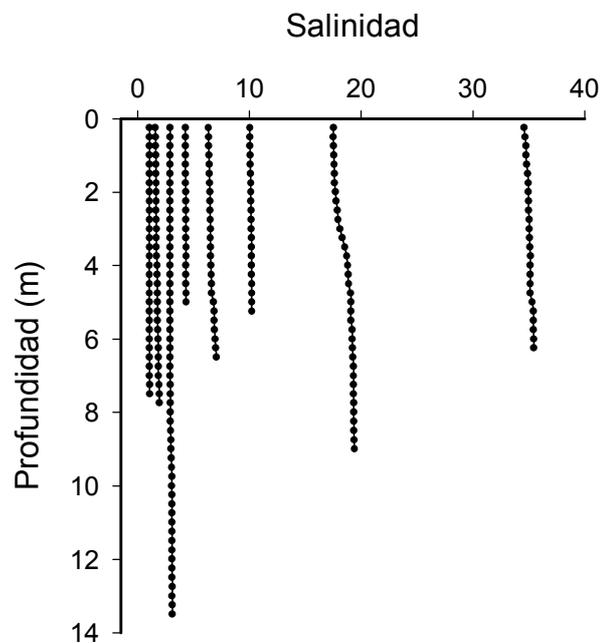


Figura 5.3. Perfiles verticales de salinidad en distintas estaciones del estuario del Guadalquivir obtenidas por medio de una sonda CTD.

En la Tabla 5.1. se recoge la composición de los tres tipos de agua empleadas en los ensayos SIES 1, 2 y 3. El agua de río ha sido tomada en el Guadalquivir a la altura de Coria del Río (Sevilla). Dicho municipio se encuentra lo suficientemente aguas arriba (a 80 Km de la desembocadura) como para asegurar que el agua recogida pertenece a la zona fluvial del Guadalquivir y que posee una escasa influencia marina. La salinidad de

este agua es relativamente baja, en torno a 0.72, y los iones más abundantes son Cl^- , HCO_3^- , Ca^{2+} y SO_4^{2-} . Cabe destacar los altos valores de pH y de la concentración de carbono inorgánico, nitrato y silicato, así como un contenido bajo en los metales estudiados. El agua de mar procede de la bahía de Cádiz y puede considerarse como un agua de mar tipo de zonas costeras, con salinidades próximas a 37, y con niveles bajos de contaminación por metales pesados. Se tomaron volúmenes lo suficientemente grandes de ambos tipos de agua para asegurar que no existieran variaciones en la composición durante los ensayos. Ni el agua de río ni la de mar fueron filtradas ni tratadas previamente, a fin de intentar reproducir las condiciones naturales que existen en el estuario.

Tabla 5.1. Composición del agua de río, agua de mar y agua tóxica empleada en los ensayos de simulación.

	Agua de Río	Agua de Mar	Agua Tóxica
Salinidad	0.586	37.098	6.448
pH (NBS)	8.5	8.1	7.7
Carbono Orgánico (mM)	3.12	2.27	1.62
S.S. (mg L⁻¹)	90.7	112.6	852.3
O.D. (mg L⁻¹)	7.31	5.66	2.95
Cloruro (mM)	4.93	598.91	56.61
Sulfato (mM)	2.64	31.36	52.97
Calcio(mM)	2.45	9.70	11.39
Zn (μM)	0.319	0.404	457.98
Cd (μM)	1.06e ⁻³	2.58e ⁻³	0.846
Pb (μM)	0.027	0.019	1.216
Cu (μM)	0.057	0.040	1.454
Amonio (μM)	1.5	3.3	20.7
Nitrito (μM)	0.9	0.8	1.2
Nitrato (μM)	391.5	2.0	1.7
Fosfato (μM)	4.7	2.5	0.7
Silicato (μM)	102.9	6.6	118.2

El agua tóxica usada en la simulación (100 L) se tomó de la zona de Entremuros, en la arqueta de entrada de aguas a la depuradora (Agosto, 1998). En la Tabla 5.1. se observa

que su pH es elevado, en torno a 7.7. Esta alcalinización ya había sido detectada a las 2-3 semanas del accidente (Mujeriego et al., 1998, informe interno del CSIC) y puede ser la responsable de la importante disminución de la concentración de metales observada. En efecto, en análisis efectuados el 11 de mayo de 1998 la concentración de Zn era de 230 ppm, mientras que el 28 de agosto era inferior a esa cifra casi un orden de magnitud. El resto de los metales experimentaron un comportamiento similar.

El caudal de entrada de agua tóxica se fijó en 0.72 mL min^{-1} , que corresponde, tras efectuar el necesario cambio de escala, al vertido de los $3.6 \cdot 10^6 \text{ m}^3$ de agua que inicialmente se encontraban embalsados en el Brazo de la Torre tras el accidente minero, en un tiempo de 14 días, y considerando un caudal medio del Guadalquivir de $60 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ (Estos datos han sido suministrados por el Dr. Francisco Gallart del Instituto de Ciencias de la Tierra Jaime Almera del CSIC y por la Confederación Hidrográfica del Guadalquivir).

5.3.2. Comportamiento de metales

En la figura 5.4. se muestran los gradientes medios de las concentraciones de Zn, Cd, Pb y Cu en la fase disuelta a lo largo del gradiente de salinidad obtenidos en los experimentos SIES 1, 2 y 3. En todos los casos, las variaciones obtenidas se alejan considerablemente de la curva de dilución teórica, indicando la existencia de una elevada reactividad, fundamentalmente a salinidades bajas. El comportamiento no conservativo de estos metales ha sido descrito en numerosos estuarios (e.g., Holliday y Liss, 1976; Duinker y Nolting, 1978; Flegal et al., 1991; Van der Berg, 1991; Windom et al., 1991; Benoit et al., 1994), y generalmente es atribuido a procesos de adsorción sobre el material particulado, tanto de naturaleza orgánica como inorgánica (Bilinski et al., 1991; Kozar et al., 1992; Dai et al., 1995; Wood et al., 1995). No obstante, otros autores han encontrado variaciones lineales con la salinidad para algunos de estos metales (Paulson et al., 1989; Harper, 1991).

La discusión sobre el comportamiento de estos cuatro metales se centra, principalmente, en el primero de los tres experimentos de simulación (SIES 1) ya que, como se indicó anteriormente, dicho ensayo es el más representativo del estuario del Guadalquivir al reproducir una situación promedio en cuanto a régimen mareal se refiere.

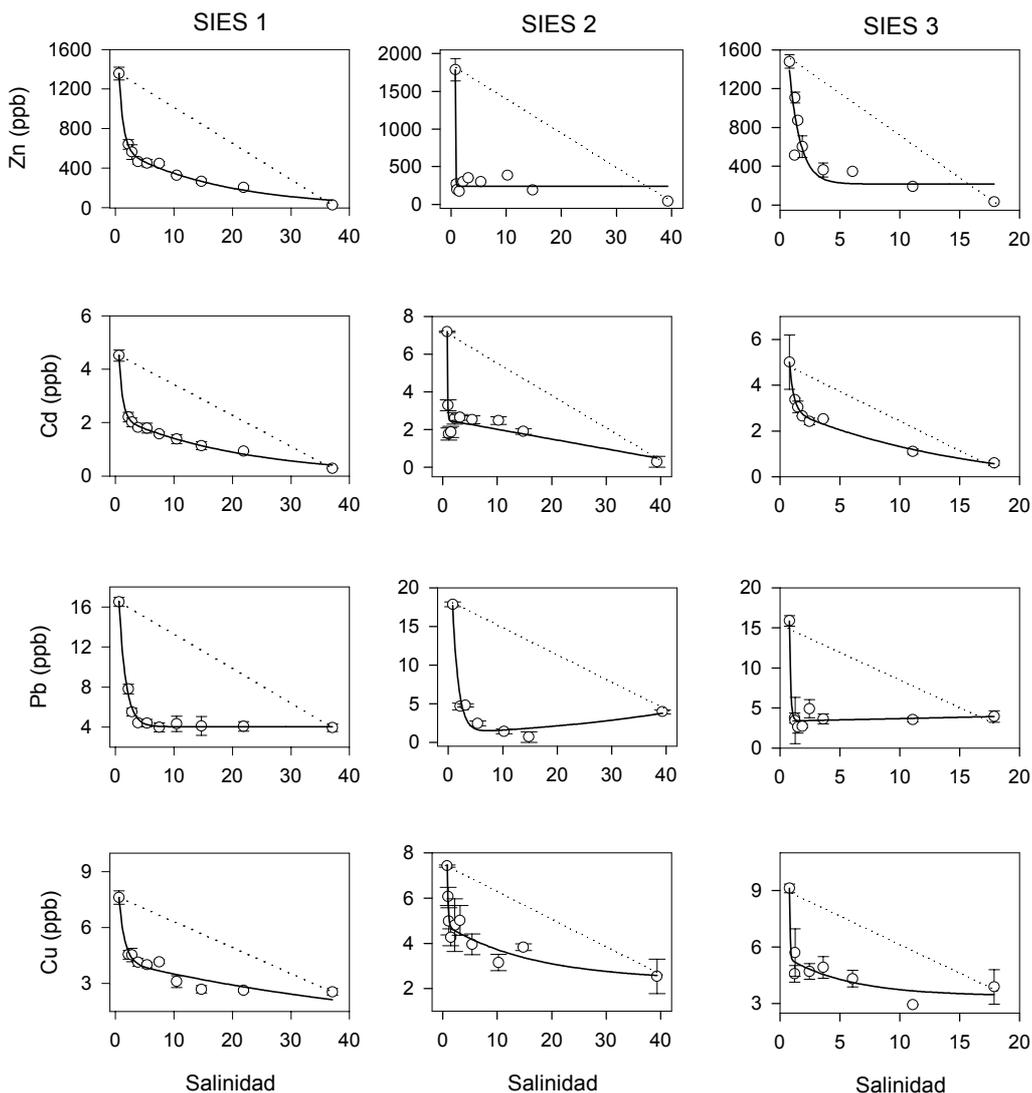


Figura 5.4. Variación de la concentración de Zn, Cd, Pb y Cu con la salinidad en los experimentos SIES 1, 2 y 3. En trazo discontinuo se señala la línea de dilución teórica; en trazo continuo, los ajustes exponenciales de las tendencias de los cuatro metales.

En la Tabla 5.2. se muestran los resultados del balance de materia efectuado tanque a tanque en el simulador para cada uno de los cuatro metales estudiados. Puede observarse cómo los valores de entrada y salida son similares en todos los casos. Como los procesos de adsorción de los metales sobre las paredes de los tanques son relativamente rápidos (del orden de horas), los resultados de las concentraciones de los cuatro metales obtenidos después del período de estabilización (varios días) no están afectados por esta clase de procesos. Por tanto, la influencia del proceso de adsorción de metales sobre las paredes de los tanques puede obviarse.

Tabla 5.2. Balance de materia, tanque a tanque, con los resultados de las concentraciones de los cuatro metales en ambas fases (disuelta y particulada) durante los experimentos de simulación.

	Zn		Cd		Pb		Cu	
	Entrada	Salida	Entrada	Salida	Entrada	Salida	Entrada	Salida
Tanque 1	45.989	45.688	0.104	0.104	0.144	0.144	0.472	0.471
Tanque 2	40.371	39.077	0.093	0.087	0.139	0.138	0.449	0.430
Tanque 3	36.009	32.394	0.078	0.074	0.136	0.133	0.395	0.394
Tanque 4	31.987	31.407	0.072	0.070	0.128	0.126	0.390	0.387
Tanque 5	28.941	27.706	0.066	0.064	0.119	0.116	0.383	0.376
Tanque 6	26.462	22.948	0.057	0.056	0.112	0.109	0.375	0.373
Tanque 7	19.971	19.091	0.050	0.046	0.107	0.107	0.345	0.342
Tanque 8	15.506	12.799	0.042	0.040	0.106	0.104	0.303	0.295

El vertido directo de las aguas tóxicas sin depurar habría producido altas concentraciones de metales en la zona de confluencia entre el Guadalquivir y el Guadiamar, fundamentalmente de Zn (1350 ppb) y de Cd (4.5 ppb). Lógicamente, este hecho es consecuencia directa de la composición del agua tóxica procedente de la balsa siniestrada, que posee concentraciones de Zn y Cd del orden de 10^5 veces superiores a las que existen en la zona fluvial del Guadalquivir. En el caso del Pb y el Cu, estas diferencias son menores, del orden de unas 50 veces, y la dilución hace que los valores máximos encontrados en los ensayos de simulación sean similares a los que se han obtenido en medidas de campo para esta zona. Si se observan las concentraciones de los cuatro metales obtenidas en el segundo y tercer ensayos de simulación, se ve que siguen una tendencia similar al primer ensayo, sólo que con algunos matices.

En los dos últimos ensayos, las concentraciones de Pb y Cu se encuentran en los mismos intervalos de concentración que en el primer ensayo y, en consecuencia, son similares a las obtenidas en las muestras de campo. Sin embargo, las concentraciones de Zn y Cd son sensiblemente mayores en estos dos últimos ensayos (en torno a 1600 ppb y 6.5 ppb respectivamente). Esto es lógico si se consideran las condiciones que se han empleado en cada simulación. Mientras que el primer ensayo describe una situación de marea media para el Guadalquivir, el segundo ensayo representa una situación de bajamar acusada y el tercero consiste en una ampliación de la zona más fluvial del estuario. De ahí que se obtengan mayores concentraciones de Zn y Cd en situaciones de

bajamar acusada, en las que la influencia del vertido de metales posee una mayor importancia sobre el sistema.

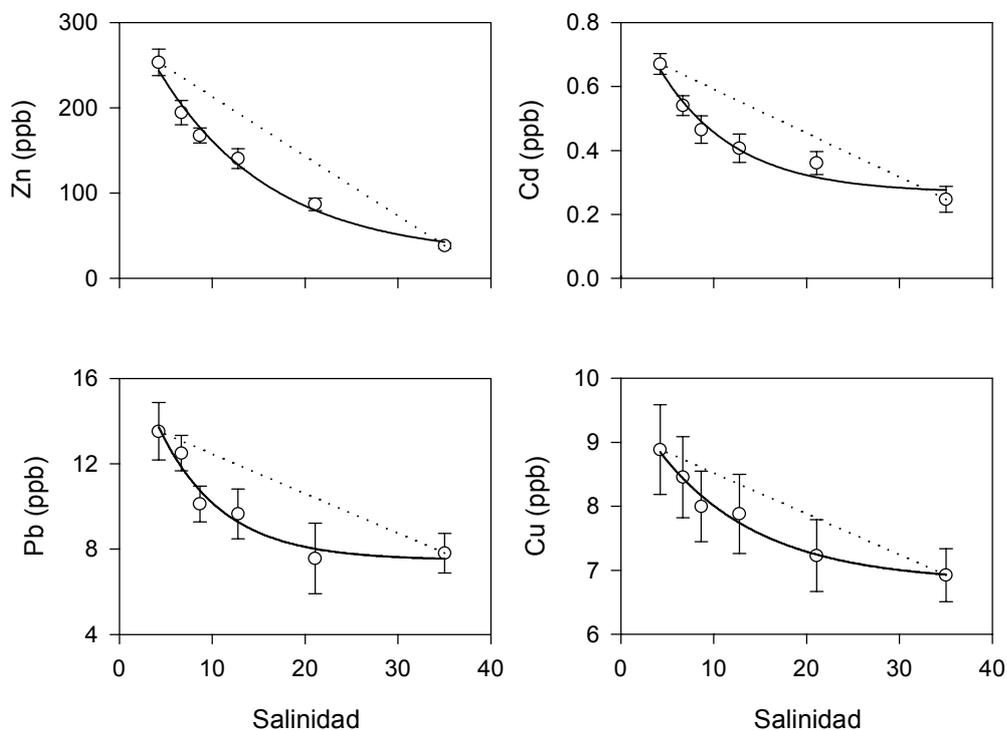


Figura 5.5. Variación de la concentración de Zn, Cd, Pb y Cu con la salinidad en seis estaciones reales del estuario del Guadalquivir (tomado de Gómez-Parra et al., 2000). En trazo discontinuo se señala la línea de dilución teórica; en trazo continuo, los ajustes exponenciales de las tendencias de los cuatro metales.

En la figura 5.5. se han representado las variaciones con la salinidad de las concentraciones medias de Zn, Cd, Pb y Cu en la fase disuelta para seis estaciones reales situadas entre la confluencia del Guadiamar con el Guadalquivir y la desembocadura de éste último en un período de tiempo comprendido entre los meses de mayo y septiembre de 1998 (Gómez-Parra et al., 2000). Puede observarse cómo las desviaciones estándar en estos casos son sensiblemente mayores que las encontradas en el primer ensayo de simulación (figura 5.4.). Este hecho viene a poner de manifiesto la propia variabilidad natural del sistema, fundamentalmente relacionada con el régimen hidrodinámico existente y la velocidad del vertido de las aguas depuradas. En cualquier caso, el comportamiento es también, y de forma clara, de tipo no conservativo, aunque las concentraciones máximas de Zn y Cd (260 ppb y 0.7 ppb, respectivamente) son considerablemente menores que las encontradas en los tres ensayos de simulación. Por el contrario, los intervalos de variación de las concentraciones de Pb y Cu son similares

para las muestras reales y las obtenidas en los tres ensayos de simulación. Lógicamente, esto pone de manifiesto la escasa influencia que poseen las características del agua vertida (depurada o no) sobre el estuario del Guadalquivir en lo que se refiere a estos dos últimos metales. A partir de los resultados obtenidos, se desprende que el vertido de agua tóxica procedente de la ruptura de la balsa de Aznalcóllar *habría producido* una fuerte contaminación por Zn y Cd.

Aunque el comportamiento de los metales estudiados en los ensayos de simulación y en los trabajos de campo es no conservativo, la disminución que se produce con la salinidad presenta tendencias diferentes. En el caso de la simulación en laboratorio del vertido sin depurar, las variaciones de la concentración se describen adecuadamente mediante una composición de dos funciones exponenciales del tipo:

$$C = a \cdot e^{-b \cdot S} + c \cdot e^{-d \cdot S} \quad [1]$$

Donde C es la concentración del metal (ppb), S la salinidad, y a, b, c, d son parámetros de ajuste. En el caso de los muestreos reales, las variaciones de concentración se ajustan adecuadamente a ecuaciones exponenciales simples del tipo:

$$C = a + c \cdot e^{-d \cdot S} \quad [2]$$

En la Tabla 5.3. se muestran los valores de los parámetros de ajuste y los coeficientes de regresión para las variaciones de las concentraciones de metales con la salinidad en el experimento SIES 1 y los obtenidos en los muestreos efectuados en el estuario del Guadalquivir. Puede observarse cómo los parámetros de ajuste del segundo término exponencial que describe las variaciones de concentración obtenidas en el primer ensayo de simulación (expresión [1]) son relativamente parecidos a los términos exponenciales de las variaciones reales (expresión [2]). En este sentido, se observa un comportamiento parecido de las concentraciones de metales para salinidades superiores a 5 en los ensayos de simulación y variaciones reales en el estuario. Sin embargo, los elevados valores de “b” correspondientes a la primera de las expresiones exponenciales de variación de la concentración con la salinidad en los ensayos de simulación, describen la intensa disminución de las concentraciones de metales a salinidades más bajas que se ha detectado. Windom et al. (1999) describen un comportamiento similar para algunos metales en la región estuárica de Patos Lagoon (Brasil), para la zona de salinidades más bajas.

Tabla 5.3. Parámetros de ajuste de las concentraciones de Zn, Cd, Pb y Cu en función de la salinidad para los ensayos de simulación y las variaciones reales encontradas en el estuario del Guadalquivir.

		a	b	c	d	r ²
Zn	Simulación	1675.1	1.3395	611.32	0.0565	0.9941
	Real	25.474	--	309.50	0.0825	0.9868
Cd	Simulación	6.0028	1.6029	2.2205	0.0456	0.9969
	Real	0.2670	--	0.6486	0.1229	0.9627
Pb	Simulación	20.637	0.8545	4.0396	0.0001	0.9944
	Real	7.4800	--	11.585	0.1460	0.9566
Cu	Simulación	6.2454	1.0234	4.2130	0.0184	0.9534
	Real	6.8137	--	3.0014	0.0920	0.9814

Estas expresiones de ajuste permiten estimar las pérdidas de metales en fase disuelta a lo largo del estuario. En este sentido, el flujo de metales [F(m)], a través de una determinada sección del estuario, se establece como:

$$F(m) = Q \cdot \left(C - S \cdot \frac{\partial C}{\partial S} \right) \quad [3]$$

donde Q es el caudal del río, que se ha fijado en $60 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$. Las pérdidas en función de la salinidad se obtienen como:

$$\text{Pérdida} = \frac{\partial F}{\partial S} \quad [4]$$

y su expresión final depende de los parámetros de ajuste. En la figura 5.6. se comparan las pérdidas de Zn, Cd, Pb y Cu a lo largo del estuario que se han obtenido en la primera prueba de simulación y en las variaciones reales. Las evoluciones de estas pérdidas con la salinidad son diferentes; en el caso del ensayo de simulación, se obtiene aproximadamente el 80% de las pérdidas para salinidades en torno a 5, mientras que en las medidas realizadas en el Guadalquivir, las pérdidas se producen de forma mucho más progresiva con el aumento de la salinidad. Estas diferencias son explicables si se considera que en las medidas reales, el punto de vertido de la depuradora está situado en el río Guadiamar, a unos 17 Km. de distancia respecto a su confluencia con el Guadalquivir. Una parte de la reactividad que se ha encontrado en las pruebas de

simulación puede deberse a reacciones que experimentan estos metales, fundamentalmente su asociación con el material particulado, en la zona de transición desde el vertido hasta el Guadalquivir. Por otra parte, las altas concentraciones de metales en las aguas sin depurar que han servido de alimentación en las pruebas de simulación pueden ser las responsables de la elevada reactividad observada a bajas salinidades.

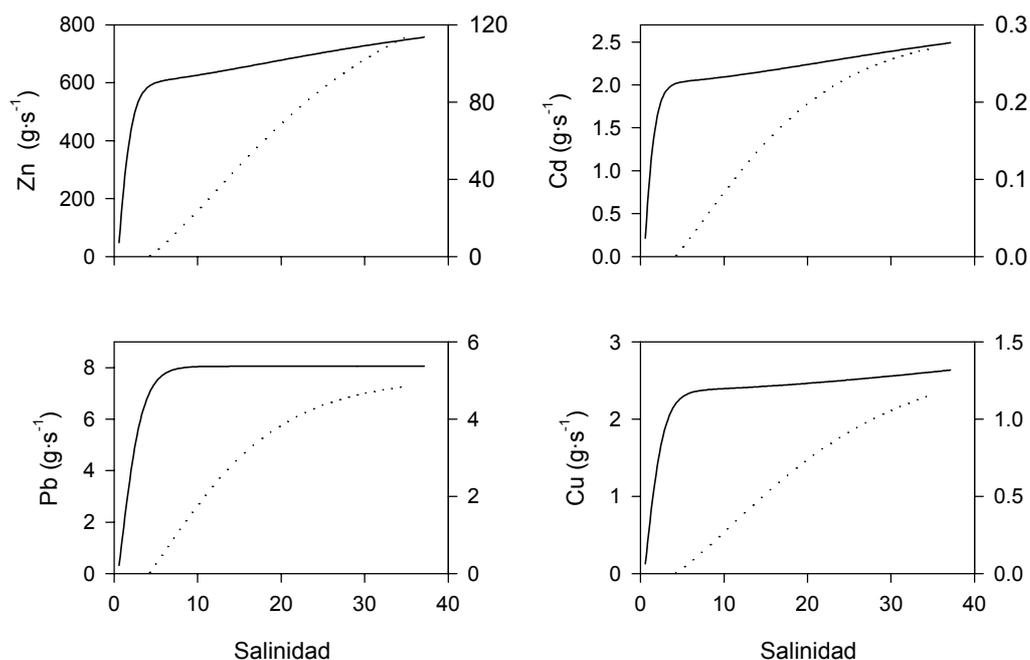


Figura 5.6. Pérdidas acumuladas de metales pesados en el estuario del Guadalquivir para el ensayo SIES 1 (línea continua) y para las estaciones reales del mismo (línea discontinua). En todos los casos, el eje de ordenadas izquierdo se corresponde con la pérdidas calculadas en SIES 1 y, el derecho, con las pérdidas en las estaciones reales.

En la figura 5.7. se han representado los factores de concentración (K_D) o coeficientes de reparto de estos metales, expresados como cocientes de concentración entre el material particulado y el agua, a lo largo del gradiente de salinidad. Los valores de K_D están comprendidos entre 10^3 y 10^4 , y son concordantes con los obtenidos por otros autores en trabajos de campo (e.g. Benoit et al., 1994; Wood et al., 1995). Si se considera que el principal mecanismo de eliminación de metales es la asociación al material particulado, los tiempos de residencia en cada uno de los tanques (en torno a 650 minutos) son suficientes para presuponer que se alcanza el equilibrio entre ambas fases (Millward et al., 1992). Aunque los valores medios de K_D se encuentran afectados por una alta desviación estándar, parece apreciarse una disminución progresiva con la salinidad para

el caso del Zn, Cd, y Cu, posiblemente asociado a procesos de desorción favorecidos por la formación de pares i3nicos con el cloruro (Turner et al, 1981).

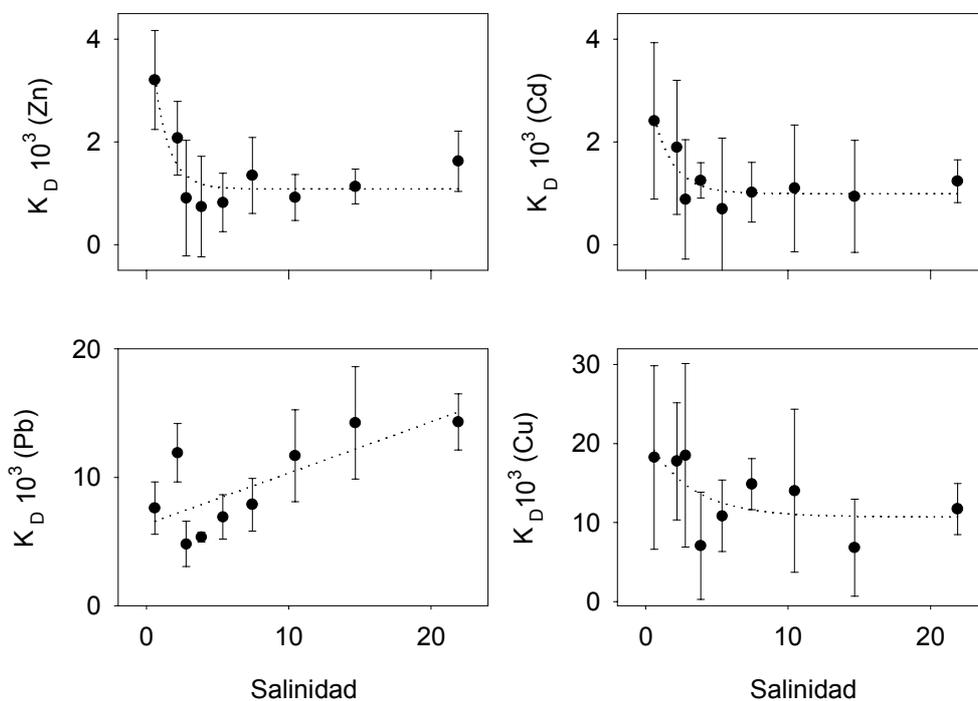


Figura 5.7. Variaci3n de los coeficientes de reparto (cociente entre las concentraciones de metales en el material particulado y en el agua) en funci3n de la salinidad.

Especiaci3n de metales

Se ha establecido la especiacion de los cuatro metales estudiados en el primer experimento de simulaci3n a lo largo del gradiente de salinidad. Para ello, se ha aplicado el modelo propuesto por Turner et al. (1981) que permite calcular la especiacion de 58 elementos traza para el agua de mar (pH 8.2) y para el agua de r3o (pH 6 y 9). Los resultados proporcionan un resumen gen3rico de la especiacion de elementos traza en aguas naturales en funci3n de la reactividad de los metales.

En concreto, se ha calculado la especiacion del Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} y Cu^{2+} con los aniones CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , Cl^- y OH^- , considerando las asociaciones formadas con m3s de una mol3cula de estos ligandos. A diferencia del trabajo realizado por Turner et. al. (1981), no se ha establecido la especiacion de estos metales con F^- , ya que no contribuyen de forma apreciable en la especiacion de estos metales.

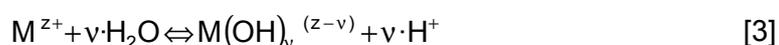
Para la formación de un complejo del tipo:



La constante de estabilidad se formula como:

$$\beta_i^* = \frac{[M \cdot L_i^{(z_+ - v \cdot z_-)}]}{[M^{z+}] \cdot [L_i]^v} \quad [2]$$

En el caso de que la formación del complejo implique una reacción de hidrólisis, la reacción se puede escribir como:



y su constante de formación vendría dada como:

$$\beta_i^* = \frac{[M \cdot (OH)^{(z-v)}] \cdot [H^+]^v}{[M^{z+}]} \quad [4]$$

Para el cálculo de las distintas constantes de estabilidad (β^*), se han aplicado las expresiones propuestas por Turner et al (1981) y que están basadas en la ecuación de Debye-Hückel:

$$\log \beta_i^* = \log \beta_i^0 + \frac{S \cdot \Delta z^2 \cdot I^{1/2}}{\left(1 + B \cdot I^{1/2}\right)} + C \cdot I + D \cdot I^2 \quad [5]$$

donde β_i^* es la constante de estabilidad para una fuerza iónica I , β_i^0 es la constante de estabilidad en agua pura, S depende de la temperatura (0.511 para 25°C), y B, C y D son parámetros de ajuste. Esta expresión es válida para todos los complejos excepto para la formación de hidróxidos, que recibe un tratamiento distinto:

$$\log \beta_i^* = \log \beta_i^0 + \frac{S \cdot \Delta z^2 \cdot I^{1/2}}{\left(1 + I^{1/2}\right)} + C \cdot I \quad [6]$$

En las Tablas 5.4., 5.5., 5.6. y 5.7., se recogen los valores de parámetros de ajuste y de las constantes a salinidad cero propuestas por Turner et. al. (1981).

Tabla 5.4. Parámetros de ajuste propuestos por Turner et. al. (1981) para el Zn.

Reacción	Log. β°	Δz^2	B	D	C
$Zn^{2+} + H_2O - H^+ \rightleftharpoons Zn(OH)^+$	-8.96	-4	2.17	0.00	0.12
$Zn^{2+} + 2H_2O - 2H^+ \rightleftharpoons Zn(OH)_2$	-16.90	-6	2.05	0.00	0.01
$Zn^{2+} + 3H_2O - 3H^+ \rightleftharpoons Zn(OH)_3^-$	-28.40	-6	0.00	-0.07	0.06
$Zn^{2+} + 4H_2O - 4H^+ \rightleftharpoons Zn(OH)_4^{2-}$	-41.20	+4	0.00	0.00	-0.20
$Zn^{2+} + Cl^- \rightleftharpoons ZnCl^+$	0.49	-4	1.20	0.00	0.21
$Zn^{2+} + 2Cl^- \rightleftharpoons ZnCl_2$	0.62	-6	2.86	0.00	0.03
$Zn^{2+} + 3Cl^- \rightleftharpoons ZnCl_3^-$	0.51	-6	0.65	0.00	0.77
$Zn^{2+} + 4Cl^- \rightleftharpoons ZnCl_4^{2-}$	0.20	-4	3.65	0.00	0.47
$Zn^{2+} + SO_4^{2-} \rightleftharpoons Zn(SO_4)$	2.36	-8	1.49	0.00	0.12
$Zn^{2+} + 2SO_4^{2-} \rightleftharpoons Zn(SO_4)_2^{2-}$	3.63	-8	0.83	0.00	0.02
$Zn^{2+} + 3SO_4^{2-} \rightleftharpoons Zn(SO_4)_3^{4-}$	2.70	0	0.00	0.16	-1.17
$Zn^{2+} + 4SO_4^{2-} \rightleftharpoons Zn(SO_4)_4^{5-}$	-0.82	16	1.52	0.00	-0.73
$Zn^{2+} + CO_3^{2-} \rightleftharpoons Zn(CO_3)$	4.75	-8	1.63	0.00	0.05

Tabla 5.5. Parámetros de ajuste propuestos por Turner et. al. (1981) para el Cd.

Reacción	Log. β°	Δz^2	B	D	C
$Cd^{2+} + H_2O - H^+ \rightleftharpoons Cd(OH)^+$	-10.08	-2	0.00	0.00	0.18
$Cd^{2+} + 2H_2O - 2H^+ \rightleftharpoons Cd(OH)_2$	-20.35	-2	0.00	0.00	0.09
$Cd^{2+} + 3H_2O - 3H^+ \rightleftharpoons Cd(OH)_3^-$	-83.30	0	0.00	0.00	0.00
$Cd^{2+} + 4H_2O - 4H^+ \rightleftharpoons Cd(OH)_4^{2-}$	-47.35	+4	0.00	0.00	-0.53
$Cd^{2+} + Cl^- \rightleftharpoons CdCl^+$	1.97	-4	1.57	0.00	0.17
$Cd^{2+} + 2Cl^- \rightleftharpoons CdCl_2$	2.59	-6	1.52	0.00	0.34
$Cd^{2+} + 3Cl^- \rightleftharpoons CdCl_3^-$	2.40	-6	1.12	0.00	0.58
$Cd^{2+} + 4Cl^- \rightleftharpoons CdCl_4^{2-}$	1.47	-4	3.65	0.00	0.47
$Cd^{2+} + SO_4^{2-} \rightleftharpoons Cd(SO_4)$	2.45	-8	1.63	0.00	0.05
$Cd^{2+} + 2SO_4^{2-} \rightleftharpoons Cd(SO_4)_2^{2-}$	3.44	-8	1.61	0.00	0.22
$Cd^{2+} + 3SO_4^{2-} \rightleftharpoons Cd(SO_4)_3^{4-}$	3.09	0	0.00	0.16	-1.17
$Cd^{2+} + 4SO_4^{2-} \rightleftharpoons Cd(SO_4)_4^{5-}$	-0.72	16	1.52	0.00	-0.73
$Cd^{2+} + CO_3^{2-} \rightleftharpoons Cd(CO_3)$	4.35	-8	1.63	0.00	0.05

Tabla 5.6. Parámetros de ajuste propuestos por Turner et. al. (1981) para el Pb.

Reacción	Log. β°	Δz^2	B	D	C
$\text{Pb}^{2+} + \text{H}_2\text{O} - \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Pb}(\text{OH})^+$	-7.71	-4	17.71	0.00	-0.02
$\text{Pb}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O} - 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Pb}(\text{OH})_2$	-17.12	-6	35.73	0.00	-0.09
$\text{Pb}^{2+} + 3\text{H}_2\text{O} - 3\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Pb}(\text{OH})_3^-$	-28.06	-6	0.00	-0.22	0.51
$\text{Pb}^{2+} + \text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{PbCl}^+$	1.58	-4	1.29	0.00	0.22
$\text{Pb}^{2+} + 2\text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{PbCl}_2$	1.82	-6	2.90	0.00	0.26
$\text{Pb}^{2+} + 3\text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{PbCl}_3^-$	1.71	-6	3.13	0.00	0.35
$\text{Pb}^{2+} + 4\text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{PbCl}_4^{2-}$	1.40	-4	3.65	0.00	0.47
$\text{Pb}^{2+} + \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{Pb}(\text{SO}_4)$	2.75	-8	1.63	0.00	0.05
$\text{Pb}^{2+} + 2\text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{Pb}(\text{SO}_4)_2^{2-}$	4.51	-8	1.61	0.00	-0.22
$\text{Pb}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{Pb}(\text{CO}_3)$	7.00	-8	1.63	0.00	0.05
$\text{Pb}^{2+} + 2\text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{Pb}(\text{CO}_3)_2^{2-}$	10.29	-8	1.61	0.00	-0.22

Tabla 5.7. Parámetros de ajuste propuestos por Turner et. al. (1981) para el Cu.

Reacción	Log. β°	Δz^2	B	D	C
$\text{Cu}^{2+} + \text{H}_2\text{O} - \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{OH})^+$	-8.00	-2	0.00	0.00	0.25
$\text{Cu}^{2+} + 2\text{H}_2\text{O} - 2\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{OH})_2$	-17.30	-2	0.00	0.00	0.20
$\text{Cu}^{2+} + 3\text{H}_2\text{O} - 3\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{OH})_3^-$	-27.80	0	0.00	0.00	-0.04
$\text{Cu}^{2+} + 4\text{H}_2\text{O} - 4\text{H}^+ \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{OH})_4^{2-}$	-39.60	+4	0.00	0.00	-0.16
$\text{Cu}^{2+} + \text{Cl}^- \rightleftharpoons \text{CuCl}^+$	0.40	-4	1.57	0.00	0.17
$\text{Cu}^{2+} + \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{SO}_4)$	2.36	-8	1.91	0.00	-0.01
$\text{Cu}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{CO}_3)$	6.75	-8	1.63	0.00	0.05
$\text{Cu}^{2+} + 2\text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{2-}$	10.69	-8	1.61	0.00	-0.22

Para la obtención de la especiación se han utilizado los ajustes exponenciales o lineales de las concentraciones con la salinidad para los metales y ligandos.

Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 5.8, 5.9, 5.10 y 5.11., donde se han representado las especiaciones en porcentajes de Zn, Cd, Pb y Cu. Cada curva representa la suma de las concentraciones de las especies formadas con un mismo ligando.

La especiación del Zn en el agua de río en el ensayo de simulación difiere de la obtenida por Turner et. al. (1981). Se observa un mayor porcentaje de Zn^{2+} y un porcentaje de $\Sigma Zn(OH)$ mucho más pequeño. Por otro lado, el porcentaje de $\Sigma Zn(CO_3)$ es sensiblemente mayor. Estas diferencias se encuentran relacionadas con la distinta composición del agua de río empleada en el cálculo de las especiaciones. Turner et. al (1981) utiliza un agua de río con una concentración 10 veces menor de CO_3^{2-} que la que existe en el Guadalquivir. Además, la constante de estabilidad de $ZnCO_3$ es más alta que la de $Zn(OH)$, por lo que se favorece la formación de $ZnCO_3$. Conforme aumenta la salinidad, el porcentaje de $ZnCO_3$ disminuye, al igual que el de $\Sigma Zn(OH)$, y las especies mayoritarias pasan a ser el Zn^{2+} y el $\Sigma ZnCl$. Esta variación se debe al aumento muy acusado de la cantidad de Cl^- en el medio con lo que se favorece la formación de pares iónicos con este anión.

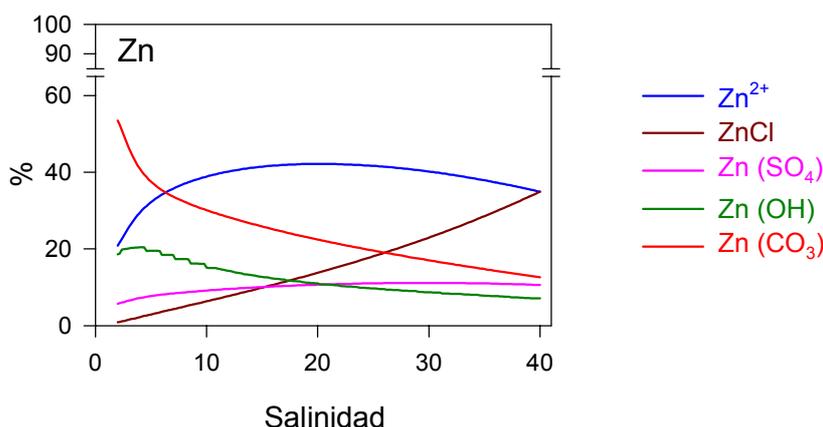


Figura 5.8. Especiación de Zn (%) frente a la salinidad en SIES 1. Cada curva representa la suma de las concentraciones de las distintas especies formadas por un mismo ligando.

La especiación del Cd presenta una tendencia muy característica. A bajas salinidades, existen porcentajes apreciables (en torno al 30%) de Cd^{2+} , de $\Sigma Cd(CO_3)$ y de $\Sigma CdCl$. Como en el caso del Zn, la atípica composición del Guadalquivir provoca que estas cantidades difieran de las que presenta Turner et al. (1981) para un agua de río típica, fundamentalmente en lo que respecta a los complejos con el carbonato. Conforme aumenta la salinidad, disminuyen los porcentajes de las anteriores especies, excepto el de $\Sigma CdCl$ ya que casi todo el Cd existente aparece en esta forma (97%). Además, en esta zona del estuario, donde el agua de río posee una influencia muy baja en la mezcla, se encuentra el mismo patrón de distribución para las especies del Cd, tanto en Turner et al. (1981) como en la simulación.

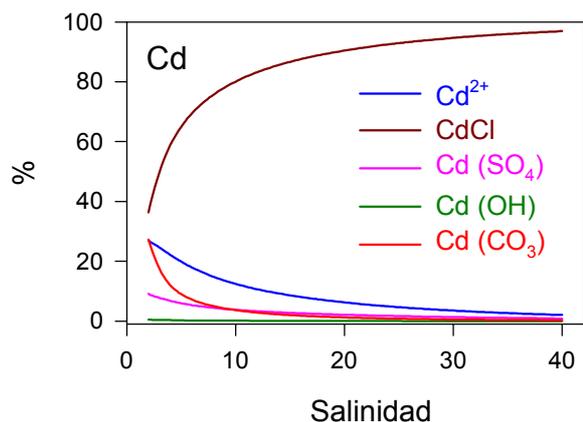


Figura 5.9. Especiación de Cd (%) frente a la salinidad en SIES 1. Cada curva representa la suma de las concentraciones de las distintas especies formadas por un mismo ligando.

La especiación del Pb también presenta una clara tendencia espacial. En la zona fluvial, casi el 100% de Pb se encuentra en forma de $\Sigma\text{Pb}(\text{CO}_3)$, para disminuir progresivamente (hasta el 80%) conforme aumenta la salinidad. Empieza a aparecer entonces un porcentaje apreciable (20%) de ΣPbCl . En el caso del Pb, el patrón de especiación de la simulación es similar al descrito por Turner et al. (1981), tanto para agua de río como para agua de mar.

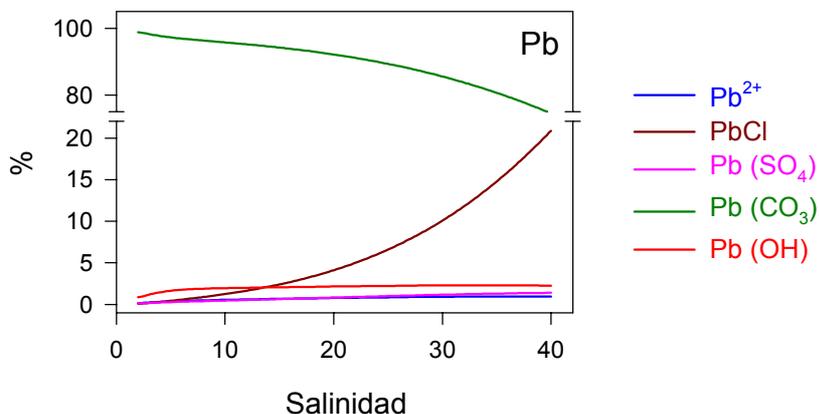


Figura 5.10. Especiación de Pb (%) frente a la salinidad en SIES 1. Cada curva representa la suma de las concentraciones de las distintas especies formadas por un mismo ligando.

En la especiación de Cu, el $\Sigma\text{Cu}(\text{CO}_3)$ constituye la especie dominante con un porcentaje de 98% prácticamente invariable a lo largo de todo el estuario y sin que se acuse un cambio apreciable con el aumento de salinidad. No obstante, Turner et al. (1981)

describen un patr3n de especiación similar para este metal, aunque el porcentaje inicial de $\Sigma\text{Cu}(\text{CO}_3)$ sea algo menor para salinidades bajas. Esta diferencia puede explicarse se3alando la gran concentraci3n de carbonato encontrada en el agua del Guadalquivir.

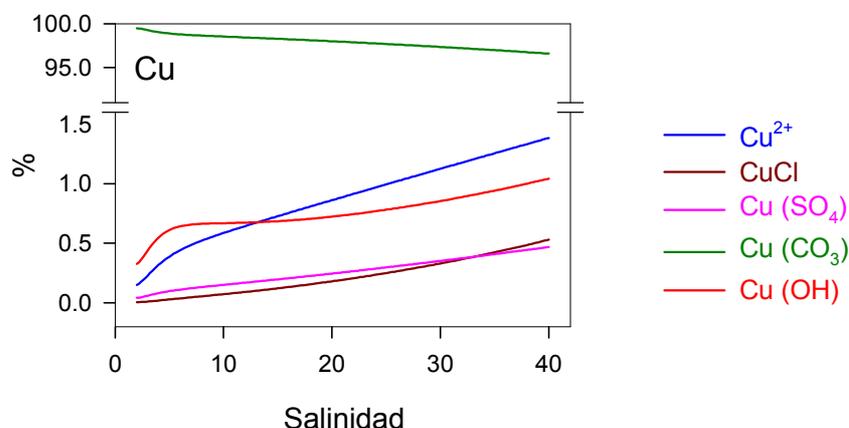


Figura 5.11. Especiación de Cu (%) frente a la salinidad en SIES 1. Cada curva representa la suma de las concentraciones de las distintas especies formadas por un mismo ligando.

En las Tablas 5.8. y 5.9. se comparan los resultados obtenidos en el primer ensayo frente a los datos calculados por Turner et al. (1981) para un agua de río típica de pH 9 y un agua de mar típica de pH 8.2.

Tabla 5.8. Especiación (%) del Cd^{2+} , Cu^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} en agua de río (Turner et al. , 1981), y la obtenida en los experimentos de simulación.

Cati3n	AGUA DE R3O (pH 9)									
	Turner et al. (1981).					Valores de simulaci3n				
	Libre	OH^-	Cl^-	SO_4^-	CO_3^-	Libre	OH^-	Cl^-	SO_4^-	CO_3^-
Cd^{2+}	47	4	1	1	47	27	1	36	27	9
Cu^{2+}	0	4	0	0	96	0	1	0	0	99
Pb^{2+}	0	5	0	0	95	0	1	0	0	99
Zn^{2+}	6	78	0	0	16	21	20	1	6	52

Tabla 5.9. Especiación (%) del Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ y Zn²⁺ en agua de mar (Turner et. al. , 1981), y la obtenida en los experimentos de simulación.

AGUA DE MAR (pH 8.2)										
Turner et al. (1981).						Valores de simulación				
Catión	Libre	OH ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ⁻	CO ₃ ⁻	Libre	OH ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ⁻	CO ₃ ⁻
Cd²⁺	3	0	97	0	0	2	0	97	1	0
Cu²⁺	9	8	3	1	79	1	1	1	1	96
Pb²⁺	3	9	46	1	41	1	3	21	1	74
Zn²⁺	46	12	35	4	3	35	7	35	10	13

5.4. BIBLIOGRAFÍA

Bale, A.J., Morris, A.W. 1981. Laboratory simulation of chemical processes induced by estuarine mixing: the behaviour of iron and phosphate in estuaries. *Estuarine Coastal Shelf Sci*, 13:1-10.

Beer, T. 1983. En: *Environmental Oceanography*. Pergamon Press, Oxford. pp:226.

Benoit, G., Otkay-Marshall, A., Cantu, A., Hood, E.M., Coleman, C.H., Corapcioglu, M.O., Santschi, P.H. 1994. Partitioning of Cu, Pb, Ag, Zn, Fe, Al y Mn between filter-retained particles, colloids, and solution in six Texas estuaries. *Mar Chem*, 45: 307-336.

Bilinski, H., Kozar, S., Plavsic, M., Kwokal, Z., Branica, M. 1991. Trace metal adsorption on inorganic solid phases under estuarine conditions. *Mar. Chem.*, 32: 225-233.

Burton, J.D., Liss, P.S., Venugopalan, V.K. 1970. The behaviour of dissolved silicon during estuarine mixing. En: *Estuarine Chemistry*. (J.D. Burton, y P.S. Liss, eds.). Academic Press, London. pp: 93-130.

Dai, M., Martin, J.M., Cauwet, G. 1995. The significant role of colloids in the transport and transformation of organic carbon and associated trace metals (Cd, Cu and Ni) in the Rhone delta (France). *Mar. Chem.*, 51:159-175.

Duinker, J.C., Nolting, R.F. 1978. Mixing, Removal and Mobilization of Trace Metals in the Rhine Estuary. *Netherlands Journal of Sea Research*, 12:205-233.

Flegal, A.R., Smith, G.J., Gill, G.A. 1991. Dissolved trace element cycles in the San Francisco Bay estuary. *Mar Chem*, 36: 329-363.

Forja, J.M. 1991. Regeneración bentónica de nutrientes en la Bahía de Cádiz. Tesis doctoral. Universidad de Cádiz. 381 pp.

Frankignoulle, M., Borges, A.V. 2001. European continental shelf as a significant sink for atmospheric carbon dioxide. *Global Biogeochem. Cycles*, 15(3): 569-576.

Gómez-Parra, A., DelValls, T.A., Forja, J.M., Sáenz, I., Riba, I. 2000. Early contamination by heavy metals of the Guadalquivir estuary after the Aznalcóllar mining spill (SW Spain). *Mar. Pol. Bull.*, 40(12): 1115-1123.

Gordeev, V.V., Sidorov, I.S. 1993. Concentration of majors elements and their outflow into the Laptev Sea by the Lena River. *Mar Chem*, 43: 33-46.

Grasshoff, K., Ehrhardt, M., Kremling, K. 1983. *Methods of Seawater Analysis*. Verlag Chemie, R.F.A.

Grimalt, J.O., Ferrer, M., McPherson, E. 1999. The mine tailing accident in Aznalcóllar. *Sci. Tot. Environ.*, 242: 3-11.

Harper, D.J. 1991. The distribution of dissolved cadmium, lead and copper in the Bristol Channel and the outer Severn estuary. *Mar Chem*, 33: 131-143.

Holliday, L.M., Liss, P.S. 1976. The behaviour of dissolved iron, manganese and zinc in the Beaulieu Estuary. En: *Estuarine Chemistry*. (Burton, J.D. y Liss, P.S., eds.). Academic Press, London. pp: 93-130.

Hosawaka, I., Ohshima, F., Kondo, N. 1970. On the concentrations of the dissolved chemical elements in the estuary of the Chikugogawa River. En: *Estuarine Chemistry* (J.D. Burton y P.S. Liss, eds.). Academic Press, London, pp: 93-127.

Kozar, S., Bilinski, H., Branica, M. 1992. Adsorption of lead and cadmium ions on calcite in the Krka estuary. *Mar Chem*, 40: 215-230.

Loring, D.H., Rantala, R.T.T. 1992. Manual for the Geochemical Analyses of Marine Sediments and Suspended Particulate Matter. *Earth-Science Reviews*, 32: 235-283.

Millero, F.J. 1992. En *Chemical Oceanography* (F. J. Millero y M. L. Sohn, eds.). CRC Press, Boca Raton (USA). pp: 59-114.

Millward, G.E., Glegg, G. A., Morris, A.W. 1992. Zn and Cu Removal Kinetics in Estuarine Waters. *Estuarine Coastal Shelf Sci*, 35:37-54.

Mujeriego, R., García, J., Knobelksdorf, J., Bourrouet, A., Querol, X., Alastuey, A., Cabanes, M. 1998. Tratamiento físico-químico de las aguas superficiales contaminadas por las aguas residuales de la mina de Aznalcóllar. Informe técnico previo realizado a petición del Dpto. de Química Ambiental del CID-CSIC de Barcelona, 19 pp.

Ortega, T. 1996. Caracterización de la Reactividad de Especies Químicas en Estuarios Mediante Técnicas de Simulación. Tesis de Licenciatura. Universidad de Cádiz. 149 pp.

Paulson, A.J., Feely, R.A., Curl, H.C., Tennant, D.A. 1989. Estuarine Transport of Trace Metals in a Buoyant Riverine Plume. *Estuarine Coastal Shelf Sci*, 28:231-248.

Ponce, R. 1996. Distribución de Zn, Cd, Pb y Cu en Sedimentos Marinos Costeros. Tesis de Licenciatura. Universidad de Cádiz. 127 pp.

Sáenz, I. 1999. Transporte y reactividad de Zn, Cd, Pb y Cu en el estuario del Guadalquivir tras el accidente minero de Aznalcóllar. Tesis de Licenciatura. Universidad de Cádiz. 129 pp.

Strickland, J.H., Parsons, R. 1972. A practical handbook of sea water analysis. *Fish. Res. Board. Can.*: 245.

Turner, D.R., Whitfield, M., Dickson, A.G. 1981. The Equilibrium Speciation of Dissolved Components in Freshwater and Seawater at 25°C and 1 atm Pressure. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45: 855-881.

Van Den Berg, C.M.G. 1991. Monitoring of labile copper and zinc in estuarine waters using cathodic stripping chronopotentiometry. *Mar Chem*, 34: 211-223.

Weiss, R.F. 1970. Dissolved Gases and Total Inorganic Carbon in Seawater. Distribution, Solubilities and Shipboard Gas Chromatography. A Dissertation for the Degree Doctor.

Windom, H., Byrd, J., Smith, R., Hungspreugs, M., Dharmvanij, S., Thumtrakul, W., Yeats, P. 1991. Trace metal-nutrient relationships in estuaries. *Mar Chem*, 32: 177-194.

Windom, H.L., Niencheski, L.F., Smith, R.G. Jr. 1999. Biogeochemistry of Nutrients and Trace Metals in the Estuarine region of the Patos Lagoon (Brazil). *Estuarine Coastal Shelf Sci*, 48: 113-123.

Winkler, L.W. 1988. Die Bestimmung des im Wasser gelösten Sauerstoffes. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, 21: 2843-2855.

Wood, T.M., Baptista, A.M., Kubawara, J.S., Flegal, A.R. 1995. Diagnostic modeling of trace metal partitioning in south San Francisco Bay. *Limnol. Oceanogr.*, 40(2): 345-358.

6. EFECTOS BIOLÓGICOS DE METALES PESADOS EN AMBIENTES ESTUÁRICOS

6.1. INTRODUCCIÓN

6.1.1. Especie empleada en el bioensayo: bivalvo *Scrobicularia plana*

El criterio de selección de organismos apropiados como indicadores biológicos para evaluar el efecto de la contaminación por metales pesados en una zona determinada fue propuesto hace casi tres décadas y permanece aún inalterado (Langston y Spence, 1995):

- a) los organismos deben ser relativamente sedentarios, a fin de que sean representativos del entorno objeto de estudio.
- b) deben tener una amplia distribución geográfica, ser abundantes, fácilmente identificables y fáciles de recoger, proporcionando material suficiente para los análisis.
- c) deben ser razonablemente tolerables a un intervalo determinado de concentraciones de metales y condiciones ambientales y ser susceptibles de experimentación en el laboratorio o “transplante” a otra zona.
- d) las poblaciones deben ser relativamente estables a fin de que puedan muestrearse al cabo del tiempo para determinar comportamientos estacionales.
- e) debe existir una correlación razonable entre la contaminación metálica en algún compartimento ambiental (agua/sedimento/alimento) y la concentración en el/los tejido/s del organismo seleccionado.
- f) el factor de concentración debe ser similar en todos los sitios.

La especie de bivalvo *Scrobicularia plana*, conocida en la zona de Cádiz como coquina de fango, es una especie que habita comúnmente en los fondos suaves intermareales de estuarios del Atlántico norte, desde Noruega hasta Senegal. Es un organismo que se alimenta de material en suspensión y soporta, como prueba su distribución geográfica, un amplio intervalo de salinidad. Se ha descrito que este bivalvo puede actuar como biomonitor de contaminación por metales en sedimentos (e.g. Bryan et al., 1985) ya que cumple los requisitos anteriormente citados. Por tanto, y debido a su ubicuidad, a su abundancia local y a su importancia en la cadena trófica estuárica, *Scrobicularia plana* fue seleccionada como una de las “especies-llave” por el Grupo de Trabajo de Sedimento Intermareal en el programa europeo COST 647 (Keegan, 1986). Por todas estas características, también se eligió a esta especie de bivalvo para llevar a cabo los experimentos de toxicidad que se han desarrollado en el simulador de estuarios.

Además, desde un tiempo a esta parte, se ha venido observando cómo las poblaciones de *Scrobicularia plana* de diversos estuarios norteeuropeos han decrecido de forma sensible o, incluso, han desaparecido. Los estudios realizados apuntan a que la causa de este decrecimiento en la densidad de *Scrobicularia plana* se debe a la contaminación gradual que afecta a grandes zonas estuáricas del norte de Europa (Poole Harbour en Inglaterra, zonas del mar de Wadden entre Alemania y Dinamarca, la costa de Frisia en Holanda, etc...) (Ruiz et al., 1995).

Evaluando el uso de *Scrobicularia plana* como indicador de la contaminación metálica, Bryan et al. (1980) recomiendan estandarizar el tamaño del bivalvo en torno a los 4 cm de longitud de concha (0.3-0.4 g de peso seco), basándose en la premisa de que cuanto más grandes son los individuos, existirá una menor probabilidad de que sean afectados por fluctuaciones de corto período en crecimiento o exposición, proporcionando así una imagen más representativa e integrada de la contaminación.

6.1.2. Metales Pesados.

Los metales pesados son considerados como uno de los principales contaminantes del medio marino (Bryan, 1976) e incluyen tanto metales no esenciales (Hg, Cd, Cr, Ag, Pb) como metales esenciales (Zn, Cu, Co).

Los metales pesados, en concentraciones traza, son constituyentes naturales del medio marino. Sin embargo, el aporte antropogénico ha aumentado considerablemente la concentración de metales pesados en zonas costeras, a las cuales llegan por varias vías. Una de las principales fuentes es el vertido de aguas residuales de distintas procedencias y, en este sentido, los sistemas semicerrados, como bahías y estuarios, están especialmente afectados por la entrada de contaminantes (Blackstock, 1984). Los metales pueden encontrarse en forma disuelta en la columna de agua, bien en forma de ión libre o complejados con ligandos orgánicos o inorgánicos, o bien pueden adsorberse sobre el material particulado (incluyendo material coloidal), tanto de naturaleza orgánica como inorgánica. La precipitación o floculación de este material particulado actúa eliminando metales pesados de la columna de agua y transfiriéndolos a los sedimentos. En este sentido, sólo una pequeña fracción abandona la zona estuárica en disolución.

La forma predominante para un metal dado en agua de mar depende fundamentalmente del pH, la salinidad, la naturaleza del metal, y del tipo y concentración de compuestos

orgánicos e inorgánicos, tanto disueltos como particulados. La especiación de los metales pesados en agua de mar es de importancia fundamental en relación con los efectos tóxicos que provocan sobre los organismos, pues afecta directamente a su biodisponibilidad (Engel y Brouwer, 1991).

La actividad humana ha contribuido a aumentar considerablemente la concentración de metales en el medio marino. Muchos de ellos tienen una elevada tendencia a formar complejos con sustancias orgánicas, y por tanto, a ser fijados en los tejidos de los organismos y a no ser excretados. En consecuencia su tiempo de vida media es largo. Este hecho constituye probablemente uno de los principales problemas asociados con su toxicidad (Waldichuk, 1974). Los primeros casos graves de intoxicación por metales pesados fueron detectados a finales de los años 50 y en los 60. Entre ellos caben destacar los debidos al consumo de moluscos y peces contaminados por mercurio en Minamata y Niigata (Japón) y a la contaminación de Cadmio de los cultivos de arroz irrigados por las aguas del río Jintsu en Toyama (Japón), que originaron la muerte de gran número de personas.

Los metales pesados son químicamente muy reactivos, de ahí la función de algunos de ellos (Cu y Zn) como catalizadores en reacciones bioquímicas. No obstante, mientras que a bajas concentraciones estos metales son esenciales y ejercen un efecto beneficioso, cuando la concentración de dicho metal esencial aumenta de forma que éste pueda alcanzar compartimentos adicionales es muy probable que produzca efectos inhibidores e incluso tóxicos (Simkiss y Mason, 1983).

Un buen ejemplo de estos efectos se encuentra en el cobre. Mientras que cantidades traza de este metal son esenciales para formar diversas metaloproteínas de moluscos, cuando la concentración de cobre en el medio aumenta aparecen efectos inhibidores y tóxicos, que justifican su extendido empleo como molusquicida. El aumento en la entrada de cobre causa una redistribución de muchos de los metales del organismo y particularmente afecta al zinc, desplazándolo en diversos tejidos. Esto afecta, presumiblemente, al funcionamiento de las metaloproteínas en los diferentes compartimentos del cuerpo (Sutherland y Major, 1981).

Las concentraciones intracelulares de iones de metales esenciales son mantenidas generalmente en niveles óptimos por mecanismos homeostáticos. En las células animales, las concentraciones de iones principales (Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , etc) son controladas por procesos activos de bombeo. Las concentraciones de los metales traza esenciales

son mantenidas por medio de sistemas de almacenamiento y de detoxificación (George, 1982).

Cuando la capacidad de homeostasis para regular las concentraciones de metales traza esenciales es superada, aparecen los efectos inhibidores y el metal se acaba convirtiendo en tóxico. Para el metal no esencial, los efectos tóxicos aparecen ya desde bajas concentraciones.

Cuando se inducen mecanismos que provocan la tolerancia al metal, los efectos inhibidores y tóxicos se desplazan a valores de concentración más elevados. Las concentraciones normalmente bajas encontradas en los tejidos para el resto de los metales, que no desempeñen función biológica alguna, es decir, los metales denominados no esenciales, generalmente reflejan la exposición ambiental, y suelen tener efectos tóxicos para los organismos. En consecuencia, tanto los metales no esenciales, como los metales esenciales en exceso, pueden tener efectos tóxicos para los organismos basados en la filtración de agua para obtener el plancton y material particulado que les sirve de alimento.

Los experimentos de laboratorio controlados en los que se utiliza una única sustancia o mezcla de ellas sobre una única especie biológica proporcionan información muy importante en el conocimiento de los efectos de los contaminantes. El desarrollo de este tipo de pruebas en las que se utilizan concentraciones ambientales y se seleccionan respuestas subletales más sensibles que la mortalidad mediante estudios más complejos, son esenciales para determinar el impacto real producido por los contaminantes. La necesidad de detectar y evaluar el impacto de los contaminantes, particularmente a bajas concentraciones y procedentes de mezclas complejas, en la calidad medio ambiental, ha llevado consigo el desarrollo de varios métodos de ensayo. A priori, la monitorización mediante el uso de análisis químicos requiere un conocimiento de los contaminantes que se están analizando, y está limitado por la sensibilidad de los métodos que se están utilizando. Sólo se mide una parte de los xenobióticos presentes, y no proporciona información sobre los efectos biológicos (DeIvalls et al., 1998). Por el contrario, la monitorización en la que se utiliza combinación de análisis químicos y ensayos de toxicidad proporciona una herramienta que integra la evaluación de la causa (niveles de contaminantes) y el efecto (efecto bajo condiciones de laboratorio), incluyendo la determinación del efecto producido por todos los contaminantes aunque no se hayan medido.

6.1.3. Biomarcadores de contaminación. Metalotioneínas.

Previamente a la muerte o a la enfermedad, los organismos y las poblaciones responden al estrés cambiando diferentes parámetros –biomarcadores- a varios niveles. Por tanto, los biomarcadores son medidas de fluidos corporales, células, tejidos,... que indican en términos bioquímicos, celulares, fisiológicos, de comportamiento o energéticos la presencia de contaminantes o la extensión de la respuesta del organismo expuesto (McCarthy y Shugart, 1990; Widdows y Donkin, 1991). En cualquier rama de la toxicología es importante medir la exposición a un agente tóxico, la extensión de cualquier respuesta tóxica y también predecir la respuesta probable. Las herramientas que permiten que esto se lleve a cabo se llaman biomarcadores (Timbrell, 1998). Estos biomarcadores permiten evaluar los efectos del estrés subletal en los organismos expuestos a sustancias contaminantes, reflejando el estado de los organismos a nivel molecular o celular como respuesta al estrés, poseen una alta relevancia en la toxicología, y son indicadores prematuros de las alteraciones medioambientales antes de que ocurra en el ecosistema un daño irreversible (Timbrell et al., 1994). Uno de los biomarcadores más usados para el estudio de los efectos asociados con la contaminación por metales son las metalotioneínas.

Dichas metalotioneínas fueron descubiertas en 1957 cuando Margoshes y Vallee buscaban un componente del tejido responsable de la acumulación natural de cadmio en el riñón. Las metalotioneínas son los únicos compuestos biológicos que contienen este metal. Sin embargo, el cadmio es sólo uno de los componentes metálicos, existiendo otros más comunes como son el Zinc y el Cobre (Kägi y Vallee, 1960). En realidad, zinc y cobre se encuentran, a menudo, como únicos constituyentes.

Concretamente, las metalotioneínas (MTs) son proteínas termoestables y ricas en cisteína, de bajo peso molecular (6000-7000 daltons), que se ligan completamente a los metales a través de uniones metal-tiolato (Kaegi y Schaeffer, 1988). Las metalotioneínas juegan un papel importante en el metabolismo normal de las células, en la adaptación a distintos tipos de estrés y en la detoxificación de metales. Están implicadas en la biodisponibilidad de metales esenciales (necesarios para el metabolismo), tales como Cobre y Zinc. También están ampliamente distribuidas y han sido identificadas en todas las clases de vertebrados superiores (Roesijadi, 1992; Stegeman et al., 1992). Puesto que también se unen a otros elementos de las columnas Ib y IIb de la tabla periódica,

juegan un papel adicional en la reducción de la toxicidad de otros metales, tales como plata, cadmio y mercurio en ambientes contaminados (Livingstone, 1993). Los mecanismos de detoxificación de metales por medio de metalotioneínas se producen cuando se activa la transcripción genética de metalotioneínas inducida por el metal presente en el medio. Ello trae como resultado un incremento de la síntesis de metalotioneínas y, en consecuencia, un aumento de las uniones de metales libres a estas proteínas (Hogstrand y Haux, 1991).

La relación entre los niveles de metal en el medio y la concentración de metalotioneínas en los tejidos animales ha permitido su uso para examinar los efectos biológicos a la exposición a metales (Hylland, Haux y Hogstrand, 1992; Livingstone, 1993; Olsson y Haux, 1986), particularmente en ambientes estuáricos (Sulaiman, George y Burke, 1991). Factores como las variaciones estacionales, la temperatura, la salinidad y el status alimentario pueden afectar a la respuesta de las metalotioneínas a la exposición a metales (Olsson, Larsson y Haux, 1996; Hylland et al., 1998).

El amplio número de factores que estimulan la biosíntesis de estas proteínas hace difícil adjudicarles una única función. Realmente, más de tres décadas después de su descubrimiento, su significado funcional es aún un tema sujeto a estudio.

Lo que no se discute es que las metalotioneínas se consideran moléculas-llave para el correcto entendimiento de los mecanismos fisiológicos relacionados con los metales. Aunque la mayoría de estudios hasta la fecha están basados en niveles de proteínas totales, algunas isoformas de metalotioneínas identificadas muestran un papel específico en la detoxificación y/o en la regulación de la presencia de metales específicos en las células.

6.2. MATERIAL Y MÉTODOS.

6.2.1. Métodos analíticos

a) Análisis de metalotioneínas

Se ha empleado el método de determinación de metalotioneínas desarrollado por Olafson y Olsson (1991).

- Pretratamiento de las muestras

Se toman muestras del órgano que se va a medir. Las metalotioneínas pueden determinarse en un órgano en concreto (el hepatopáncreas, por ejemplo) o bien en el cuerpo entero del espécimen (en esta Memoria se optó por la segunda opción). Una vez separado el cuerpo de la almeja de las valvas, se pesa (en torno a 1 g de peso fresco a fin de tener suficiente cantidad de biomasa). Dicho peso se multiplica por 3 y se añade la cantidad obtenida en mL de una disolución tampón de Trizma-HCl/Trizma-Base 0.1M y pH=8.1. A continuación debe homogeneizarse completamente la mezcla por medio de una Ultraturrax manteniendo en todo momento la mezcla a 4°C.

Una vez que la muestra está homogeneizada se transfiere a un tubo de centrifuga y se centrifuga durante 120 minutos, a 50000 g y a 4°C. Posteriormente se extrae el sobrenadante cuidando no arrastrar la grasa que puede aparecer en la superficie y se transfiere a un eppendorf, almacenándose en oscuridad a -80°C hasta su análisis. Dicho sobrenadante se utiliza tanto para la medición de metalotioneínas como de proteínas totales (apartado 2.2.)

La segunda parte del pretratamiento comienza tomando 100 µL de cada eppendorf y añadiéndoles 900 µL de una solución de NaCl al 0.9%. A continuación, se somete dicha muestra a desnaturalización, calentándola a 95°C durante 4 minutos e inmediatamente se introduce en hielo. Seguidamente se centrifuga durante 15 minutos, a 10000 g y a 4°C y se introduce el sobrenadante en un eppendorf dejando la muestra preparada para medir.

- Determinación de las muestras

Las metalotioneínas se determinan por medio de voltamperometría de redisolución anódica, con un equipo Metrohm VA 646 Stand VA 647. El electrodo de trabajo (Metrohm, 6.1246.020) sobre el que se amalgama el metal procedente de la muestra durante el proceso de preconcentración se utilizó en el modo DPP-SMDE (electrodo de gota de mercurio estática).

Como electrodo de referencia se empleó uno de Ag/AgCl, KCl (3M) (Metrohm, 6.0726.100) y, como electrodo auxiliar, uno de platino (Metrohm, 6.0343.000).

El análisis se realiza tras la adición de 10 mL de electrolito MT (Co (NH₃)₆ Cl₃ 1.2 mM; CINH₄/NH₄OH 1M) y de 150 µL de Tritón X-100 (0.025%) a 100 µL de muestra y comienza el protocolo de medición. Pasado un tiempo predeterminado, es necesario efectuar tres adiciones estándar de 10 µL de patrón comercial de metalotioneína de

conejo ($50 \mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$) para poder cuantificar correctamente la concentración de la muestra en cuestión.

b) Análisis de proteínas totales

El análisis del contenido de proteínas totales (del citosol) en *Scrobicularia plana* tras la finalización del bioensayo se llevó a cabo a partir del producto obtenido tras el tratamiento de la muestra, según se ha explicado en el apartado 2.1. de esta Memoria.

El método utilizado en este análisis fue el del azul de *Coomassie* descrito por Bradford (1976). Su fundamento es el siguiente:

Se disuelven 100 mg de Serva Blue (Serva, Westbury, NY) en una mezcla de ácido fosfórico al 85% y 50 mL de etanol al 95%. Una vez disuelto, se enrasa a un volumen de 1 litro con agua calidad Milli-Q.

Se toma una alícuota de $20\mu\text{L}$ de muestra y se vierte en tubos de ensayo. Se añaden $50\mu\text{L}$ de NaOH (1M) a cada tubo. Tras esto, se añade 1 mL de reactivo virante (reactivo de Bradford), y se incuba durante 30 minutos.

A continuación, se determina la absorbancia de las muestras en espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm utilizando cubetas de cristal o poliestireno. Para la preparación de la curva estándar, se utilizó proteína purificada, Bovine Serum Albumin (SIGMA).

c) Determinación de los factores de bioacumulación de metales pesados

Para determinar la concentración de metales en bivalvos es preciso someter las muestras a un proceso previo de digestión ácida.

Al término del período de exposición, se congelan los ejemplares de bivalvos expuestos a contaminación por metales. Posteriormente se separan los cuerpos de las almejas de las valvas y se liofilizan. A continuación se molturan dichos cuerpos liofilizados. Se pesan entre 0.1 y 0.2 gramos del homogeneizado molturado y se transfieren a un tubo de ensayo de vidrio.

Se añaden 1 mL de ácido nítrico *Suprapur* y 400 μ L de peróxido de hidrógeno calentándose los tubos a 95°C durante una hora. A continuación, se filtra el resultante de la digestión a través de un filtro libre de cenizas recogiendo lo filtrado en un matraz aforado de 10 mL, el cual se enrasa con agua destilada.

Tras este pretratamiento, las muestras se miden mediante absorción atómica de llama para cuantificar Zn y Cu y en horno de grafito para Cd y Pb.

6.2.2. Manipulación de organismos

Los bivalvos empleados en este bioensayo se recolectaron en el estuario del Guadalete (bahía de Cádiz). Se seleccionaron 80 ejemplares, a razón de 10 por cada tanque, de tamaño uniforme. En la Tabla 6.1. se muestran los valores de talla y peso para seis individuos elegidos al azar.

Tabla 6.1. Longitudes y pesos de un conjunto de bivalvos seleccionados al azar del total de almejas que se emplearon en el experimento SIES 18. Los distintos pesos están expresados en gramos y, la longitud, en centímetros.

Bivalvo	Longitud	Peso completo	Peso valvas	Peso húmedo
1	4.45	6.19	3.26	2.93
2	4.30	5.14	3.09	2.05
3	4.50	5.57	3.25	2.32
4	4.80	6.34	4.18	2.16
5	4.95	8.00	4.78	3.20
6	4.60	6.04	3.48	2.56
Media	4.60	6.21	3.67	2.54

Previamente a la puesta en marcha del experimento, los bivalvos estuvieron depurándose durante diez días en un flujo continuo de agua limpia y oxigenada y se los mantuvo en ayunas, en un tanque de 70 L. Tras esto, se ubicaron en los ocho tanques, donde se mantuvieron aclimatándose a las respectivas salinidades de cada uno de ellos durante siete días más antes de dar comienzo al bioensayo.

Con objeto de verificar el estado natural que presentaban los organismos, se determinó la concentración de metalotioneínas en una muestra representativa de bivalvos tras su recolección. Posteriormente, tras el período de depuración, también se analizó la concentración de metalotioneínas a fin de ver si éste proceso había sido efectivo. En

todos los casos se constató que, efectivamente, los bivalvos disminuyeron la concentración de metalotioneínas tras la depuración hasta niveles considerados normales para bivalvos no expuestos a contaminación metálica.

6.2.3. Ensayos realizados

A fin de establecer el factor de bioacumulación de ciertos metales pesados (Zn, Cd, Pb y Cu) y algunos de sus efectos subletales sobre un molusco bivalvo a diferentes salinidades, se realizó un único experimento (SIES 18).

El gradiente de salinidad elegido para esta prueba consistió en una ampliación de la zona más marina del estuario, abarcando valores de salinidad entre 10 y 36. De esta forma se pretendía no alterar mucho a los bivalvos sometiéndolos a un choque osmótico excesivo.

El diseño y las características de este experimento han sido detallados prolijamente en el apartado 2.4. del Capítulo 2.

6.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.3.1. Metales disueltos

En la figura 6.1. se presenta la variación de las concentraciones de Zn, Cd, Pb y Cu disueltos a lo largo del gradiente de salinidad durante el bioensayo. En todos los casos, las variaciones obtenidas se alejan considerablemente de la línea de dilución teórica, indicando la existencia de una elevada reactividad, fundamentalmente a salinidades bajas. El comportamiento no conservativo de estos metales ha sido descrito en numerosos estuarios (e.g., Holliday y Liss, 1976; Duinker y Nolting, 1978; Flegal et al., 1991; Van der Berg, 1991; Windom et al., 1991; Benoit et al., 1994; García-Luque et al., 2002), y generalmente es atribuido a procesos de adsorción sobre el material particulado, tanto de naturaleza orgánica como inorgánica (Bilinski et al., 1991; Kozar et al., 1992; Dai et al., 1995; Wood et al., 1995).

Como se reseñó en el Capítulo 5, y de igual manera que señalan García-Luque et al. (2002), los procesos de adsorción de los metales sobre las paredes de los tanques son relativamente rápidos (del orden de horas). Por tanto, los resultados de las concentraciones de los cuatro metales obtenidos después del período de estabilización

(siete días) no están afectados por esta clase de procesos. De ahí que la influencia del proceso de adsorción de metales sobre las paredes de los tanques pueda obviarse en este caso.

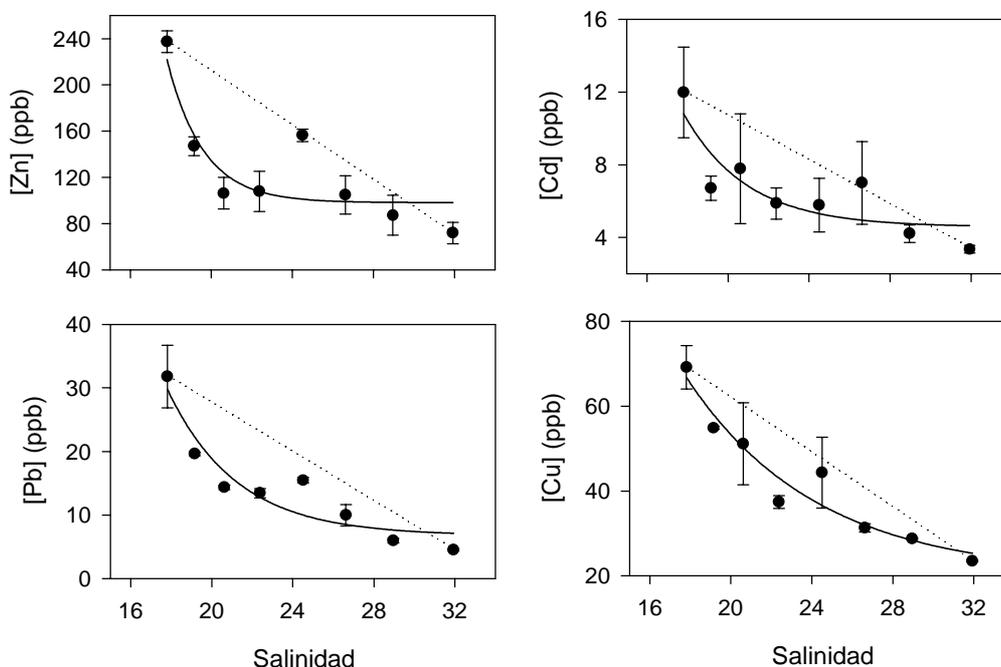


Figura 6.1. Variación de la concentración en la fase disuelta de Zn, Cd, Pb y Cu a lo largo del gradiente de salinidad simulado en SIES 18. En trazo discontinuo se señala la línea de dilución teórica; en trazo continuo, los ajustes exponenciales de la variación de las concentraciones de los metales con la salinidad.

Aunque el comportamiento de estos cuatro metales en el bioensayo es no conservativo, la disminución de la concentración de los mismos (en la fase disuelta) que se produce con la salinidad presenta una tendencia similar: en los cuatro casos se ajusta adecuadamente a una ecuación exponencial del tipo:

$$C = y_0 + a \cdot e^{-b \cdot S} \quad [1]$$

En la Tabla 6.2. se presentan los valores de los parámetros de ajuste (y_0 , a y b) y los coeficientes de regresión para las variaciones de las concentraciones de metales con la salinidad en el experimento descrito.

Tabla 6.2. Parámetros de ajuste y coeficientes de regresión para la variación de Zn, Cd, Pb y Cu con la salinidad en SIES 18.

	y_0	a	b	r^2
Zn	98.23	$263.7 \cdot 10^5$	0.5597	0.745
Cd	4.534	1539.94	0.3094	0.739
Pb	6.762	4197.42	0.2924	0.885
Cu	20.11	743.18	0.1554	0.932

Las concentraciones en agua de Zn, Cd, Pb y Cu detectadas a lo largo del gradiente de salinidad en SIES 18, se encuentran dentro de los intervalos de valores que presentan un gran número de estuarios reales contaminados por metales pesados y otros estudios de simulaciones de especiación de metales (e.g. Tipping et al., 1998). En la Tabla 6.3. se comparan los intervalos de concentraciones para los cuatro metales registrados en algunos trabajos y los obtenidos en SIES 18.

Tabla 6.3. Intervalos de concentración (en ppb) para Zn, Cd, Pb y Cu registrados en una serie de estuarios que presentan contaminación por metales pesados.

Estuario	Zn	Cd	Pb	Cu	Referencia
Guadalquivir (ESP)	[25-200]	[0.10-1]	[2-25]	[2-20]	Gómez-Parra et al, 2000
Humber (UK)	[26.1-65.4]	-----	[1-4.1]	[6.4]	Tipping et al., 1998
Meuse (HOL)	[1-216]	[0-0.14]	[0.1-6.5]	[2.6-2.9]	Van der Berg et al., 2001
Swansea Valley (UK)	[10-1500]	[1-5]	[.025-.045]	[5]	Blake et al, 2001
SIES 18 (CASEM)	[50-240]	[4-16]	[10-180]	[1-40]	Capítulo 6

Especiación de Zn, Cd, Pb y Cu.

Se ha establecido la especiación de estos cuatro metales a lo largo del gradiente de salinidad simulado en SIES 18. Para ello, se ha aplicado el modelo propuesto por Turner et al. (1981) de idéntica forma a la descrita en el Capítulo 5. En concreto, se ha realizado la especiación de Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} y Cu^{2+} con los aniones CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , Cl^- y OH^- , considerando las asociaciones formadas con más de una molécula de estos ligandos.

Los resultados se muestran en la figura 6.2., donde se han representado las especiaciones en porcentaje de Zn, Cd, Pb y Cu. Cada curva representa la suma de las concentraciones de las especies formadas con un mismo ligando.

En dicha figura se aprecia una especiación de los cuatro metales muy parecida a la que Zn, Cd, Pb y Cu presentaron en el capítulo anterior (apartado 5.3.2.). Aunque los valores que toman las distintas especies en el experimento SIES 18 difieran de los que presentaron en SIES 1, las tendencias de dichas especies con la salinidad son prácticamente iguales. Y, como también se reseñó anteriormente, los resultados obtenidos son coincidentes con el comportamiento descrito por Turner et al. (1981).

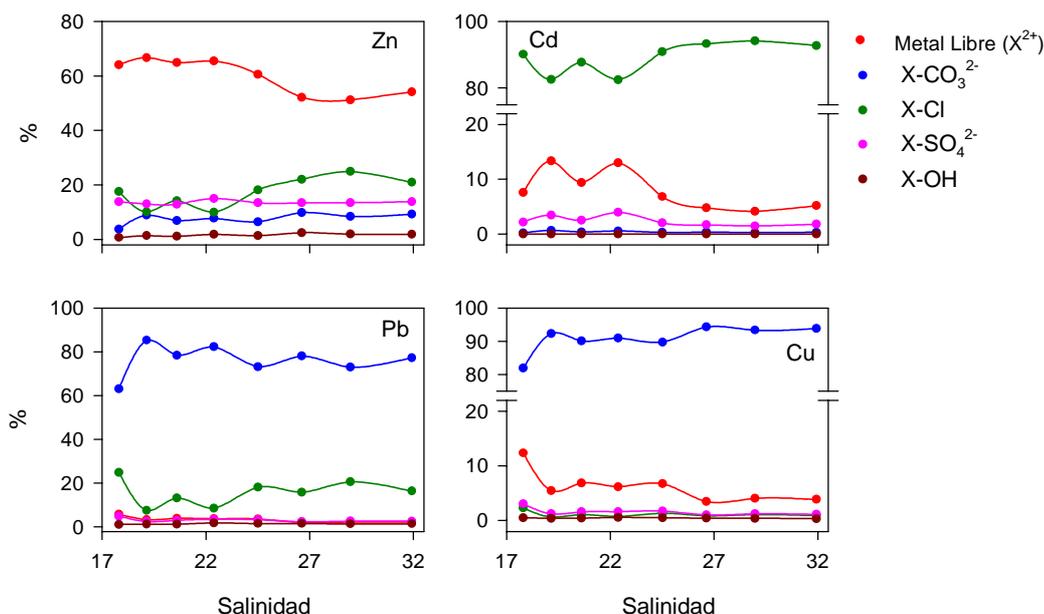


Figura 6.2. Especiación (%) de Zn, Cd, Pb y Cu a lo largo del gradiente de salinidad simulado en SIES 18. Cada curva representa la suma de las concentraciones de las distintas especies formadas por un mismo ligando.

6.3.2. Bioacumulación

Se ha determinado la concentración de los cuatro metales en tres ejemplares de *Scrobicularia plana* en cada uno de los tanques del simulador. En la figura 6.3., se presentan las variaciones, a lo largo del gradiente de salinidad, de las concentraciones de Zn, Cd, Pb y Cu en los ejemplares seleccionados en cada tanque. En esa figura se observan dos tipos distintos de comportamiento: de un lado, la cantidad de Zn y Cd bioacumulados no posee una tendencia definida con la salinidad, no pudiéndose afirmar que aumente o disminuya con el incremento de la misma. Por otro lado, la cantidad de Pb y Cu bioacumulados sí parece presentar una tendencia definida a disminuir con el

incremento de salinidad. De hecho, la bioacumulación de ambos metales desciende de forma exponencial con la salinidad ajustándose adecuadamente a una ecuación del tipo:

$$C = y_0 + a \cdot e^{-b \cdot S} \quad [2]$$

expresión que coincide con la que representa la variación con la salinidad de la concentración de Pb y Cu en la fase disuelta (ver ecuación [1]).

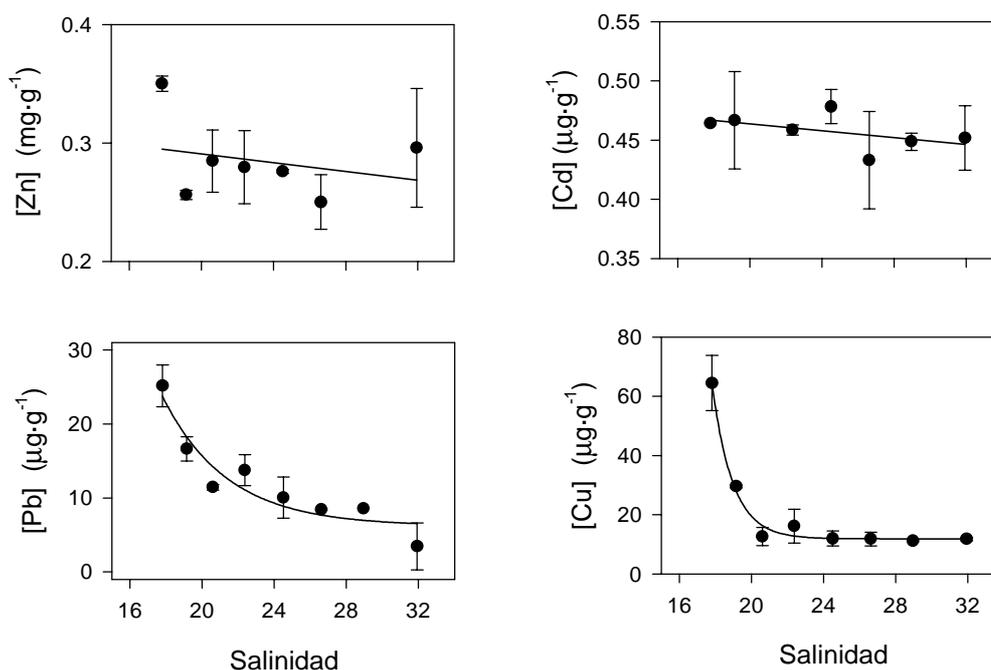


Figura 6.3. Variación de la cantidad de Zn, Cd, Pb y Cu bioacumulados por los organismos con relación al peso total de los mismos a lo largo del gradiente de salinidad en SIES 18.

En la Tabla 6.4. se presentan los valores de los parámetros de ajuste (y_0 , a y b) y los coeficientes de regresión para las variaciones de las concentraciones de Pb y Cu bioacumulados.

Tabla 6.4. Parámetros de ajuste y coeficientes de regresión para la bioacumulación de Pb y Cu con la salinidad en SIES 18.

	y_0	a	b	r^2
Pb	6.1987	4197.42	0.2924	0.889
Cu	11.89	$341.6 \cdot 10^5$	0.1554	0.988

Se ha calculado también el factor de bioacumulación de los cuatro metales. Dicho factor se obtiene del cociente entre la concentración del metal bioacumulado y la concentración del metal disuelto. Los resultados obtenidos se presentan en la figura 6.4.

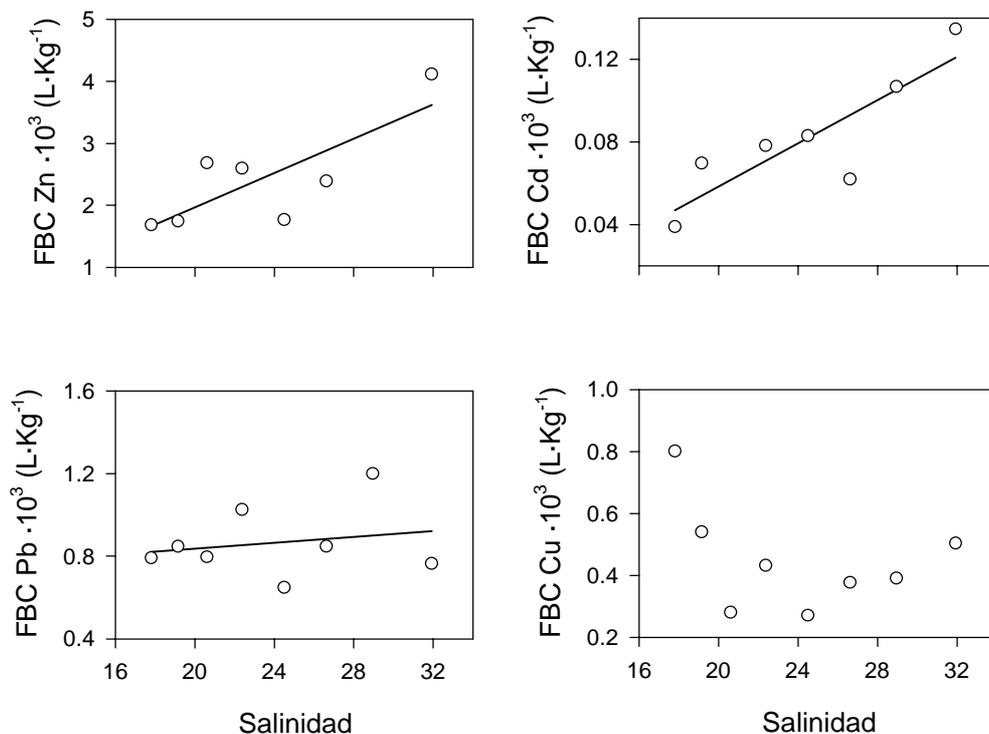


Figura 6.4. Variación de los factores de bioacumulación calculados para Zn, Cd, Pb y Cu a lo largo del gradiente de salinidad simulado en SIES 18.

En dicha figura se observa que el factor de bioacumulación crece de forma aproximadamente lineal con la salinidad en el caso de Zn y de Cd. Esto parece indicar que, conforme aumenta la salinidad, es más eficaz el mecanismo de bioacumulación; de ahí que, a valores elevados de salinidad, se bioacumule prácticamente lo mismo que a valores bajos de la misma aunque la concentración de Zn y Cd disueltos en el agua descienda con el aumento de salinidad (este comportamiento es el que se observa en la figura 6.3.).

Por otra parte, el factor de bioacumulación de Pb presenta un comportamiento con la salinidad no muy bien definido, tendiendo a oscilar en torno a un valor medio. Por tanto, la bioacumulación de Pb parece que no dependerá de la salinidad sino que estará regida sólo por la cantidad de Pb disuelto en el medio a lo largo del gradiente de salinidad. Así, a

valores altos de salinidad, que es donde existe una menor concentración de Pb disuelto, también se producirían los menores valores de bioacumulación. De nuevo este comportamiento es el que se observa en la figura 6.3.

El factor de bioacumulación del Cu parece encontrarse en una situación intermedia a los dos casos anteriores, si bien a la vista de la variación de la bioacumulación del mismo en la figura 6.3. parece que dicha bioacumulación está regida por la cantidad de Cu disuelto en el medio.

No obstante, para poder afirmar inequívocamente las conclusiones que se extraen de la discusión anterior, sería necesario el desarrollo de un elevado número de bioensayos estáticos (uno por cada metal, a cada salinidad y a cada concentración metálica deseada) donde no variara la salinidad para distintas concentraciones de metales disueltos en el agua. De esta manera, podría separarse el efecto del aumento de salinidad del de la entrada de metales por uno u otro extremo del simulador. Una forma menos laboriosa de llevar a cabo este objetivo, aunque no tan definitiva, sería el uso de algún tratamiento estadístico adecuado a los valores experimentales determinados de las variables descritas. En el apartado 6.3.4 se presentan los resultados obtenidos tras dicho tratamiento estadístico.

6.3.3. Metalotioneínas

Se ha cuantificado la concentración de metalotioneínas en ejemplares de *Scrobicularia plana* en cada uno de los tanques del equipo. La concentración de metalotioneínas se ha referido al peso de proteínas totales en cada bivalvo (que también han sido determinadas). Por tanto, la concentración de metalotioneínas queda expresada como μg de metalotioneínas por mg de proteínas totales. En la figura 6.5. se presenta la variación de la concentración de metalotioneínas a lo largo del gradiente de salinidad para los ejemplares de cada tanque en el bioensayo descrito. En dicha figura, no se aprecia *a priori* ningún comportamiento claro con la salinidad. La relación entre niveles de metalotioneínas y salinidad fue estudiada (en muestras discretas) por Amiard-Triquet et al. (1998) en poblaciones de *Macoma balthica* y *Mytilus edulis*. No se encontraron evidencias de una influencia clara de la salinidad sobre los niveles de metalotioneínas. De forma similar, Mouneyrac et al. (1998), tampoco encontraron diferencia alguna entre niveles de metalotioneínas en tejidos de *Crassostrea gigas* recogidos a lo largo de un gradiente de salinidad en el estuario del Gironde.

No obstante, la salinidad sí influye en la concentración de los metales disueltos, lo que redundaría en su biodisponibilidad. De hecho, publicaciones recientes señalan la relación existente entre salinidad y concentración de metalotioneínas. Así, por ejemplo, Legras et al. (2000) señalan que la salinidad es un factor natural que influye en la acumulación de metales, por lo que también influye en la cantidad de metal entrante que potencialmente necesita asociarse a metalotioneínas en algún lugar dentro del organismo. Existe así un mecanismo potencial para relacionar variaciones en la salinidad con concentraciones de metalotioneínas. Mouneyrac et al. (2001) apuntan que el principal factor que causa diferencias entre cangrejos procedentes de dos zonas distintas del estuario del Gironde es, precisamente, el gradiente de salinidad entre ambos sitios. Esto es debido a que el gradiente de salinidad en el estuario influye en la especiación química de los metales y, por ende, en la biodisponibilidad de los mismos (figura 6.2.). Así, la influencia de la salinidad sobre la concentración de metalotioneínas puede ser directa vía procesos fisicoquímicos y/o por interacción entre estos y procesos fisiológicos (Legras et al., 2000).

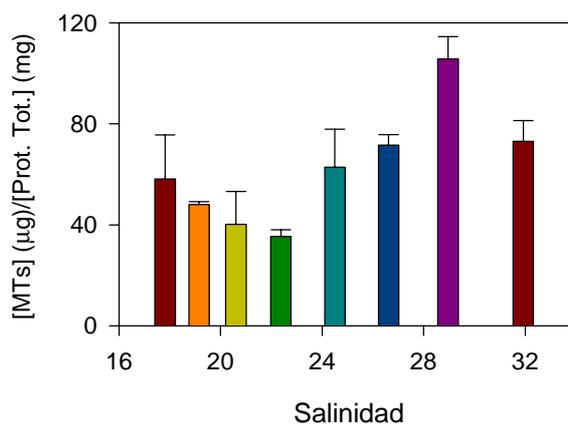


Figura 6.5. Variación de la concentración de metalotioneínas, referida a peso de proteínas totales, con la salinidad en el experimento SIES 18.

Además de la salinidad, existen una serie de factores –bióticos y abióticos- que pueden interferir en la síntesis de metalotioneínas como respuesta a la existencia de metales no esenciales o a un exceso de metales esenciales. Dichos factores son el sexo del individuo, la relación edad/talla, el peso del órgano seleccionado, cambios estacionales,... De ahí que sea necesario intentar determinar los factores mayoritarios que controlan la concentración de metalotioneínas en un determinado órgano o en un individuo completo (Mouneyrac et al., 2001). Una forma ampliamente extendida de llevar a cabo este intento se realiza por medio de tratamientos estadísticos, de tal manera que sea posible dilucidar

qué factor o factores poseen un mayor peso específico en la síntesis de metalotioneínas (apartado 6.3.4.). También es importante tener presente que, como el grado de expresión de metalotioneínas varía relativamente entre especies, órganos y metales, la presencia de un metal en el ambiente no siempre da como resultado un incremento de los niveles de metalotioneínas (Cosson, 2000). Así, aparecen una serie de publicaciones que intentan destacar que no siempre las metalotioneínas pueden ser consideradas como un biomarcador útil de la contaminación metálica de forma absoluta (George et al., 2000; Geret y Cosson, 2000; Legras et al., 2000; Mouneyrac et al., 2001; Rotchell et al., 2001).

6.3.4. Análisis multivariante: Análisis factorial

Como se ha comentado anteriormente, la síntesis de metalotioneínas no sólo depende de la concentración de metales disueltos a la que están expuestos los bivalvos en el ensayo sino que depende también de otra serie de factores, tanto bióticos como abióticos. Por otro lado, con lo expuesto hasta ahora, tampoco es posible afirmar que la menor bioacumulación que se aprecia con el incremento de salinidad (al menos en Pb y Cu) dependa directamente de dicho incremento de salinidad. Podría deberse simplemente al hecho de que la entrada de metales al estuario se produce a través del primer tanque (el de menor salinidad), por lo que lógicamente existirá una mayor bioacumulación en esa zona más fluvial del estuario debida al mero hecho de que existe una mayor concentración de metales disueltos en la misma.

Debido a estos interrogantes se hace necesario someter todos los datos disponibles a un análisis estadístico a fin de establecer las relaciones presentes entre todos estos factores. El tratamiento estadístico elegido por su idoneidad ha sido un análisis factorial, con extracción de los factores por componentes principales (mediante el programa Statistica™). El análisis factorial tiene por objeto explicar de forma simple y gráfica las relaciones observadas entre un número de variables originales en función de un número menor de factores (definidos como combinación lineal de las variables originales), escogidos por poseer una significación de especial interés para el campo de estudio, o definidos por incluir una serie de propiedades no explícitas pero comunes a partir de las variables (Sanz Perucha, 1993). El método de los componentes principales, aplicados en este estudio, extrae aquellos factores que justifican una proporción significativa de la varianza total de los datos. En función de la varianza que explique cada factor, éste suministrará más o menos información respecto al conjunto de datos originales.

Si el universo muestreado es homogéneo, es de esperar que el primer factor tenga un valor propio mucho mayor que los restantes. En el caso de un universo heterogéneo, los valores propios son más parecidos y la varianza explicada queda más repartida entre los tres o cuatros primeros factores. Al tratar los datos de este estudio, se observa que, en este caso, el universo muestreado es homogéneo.

Como variables, se han empleado las siguientes: concentración de metalotioneínas, concentración de Zn, Pb, Cd y Cu disueltos, concentración de Zn, Cd, Pb y Cu en los moluscos y salinidad.

El análisis presenta como resultado la existencia de cuatro factores que explican el 94.5% de la varianza. En la Tabla 6.5. se presentan los resultados del análisis factorial.

Tabla 6.5. Resultados de la aplicación de la técnica de extracción de los factores por componentes principales en SIES 18.

Variable	Factor 1	Factor 2	Factor 3	Factor 4
[MTs]	-0.2266	-0.9491	-0.1851	-0.0022
Salinidad	-0.8248	-0.4823	-0.2004	-0.0306
[Zn]_{DISUELT.}	0.8069	-0.0025	0.3002	0.4216
[Cd]_{DISUELT.}	0.7973	0.2174	0.1655	0.4294
[Pb]_{DISUELT.}	0.8422	0.2154	0.2278	0.3810
[Cu]_{DISUELT.}	0.8351	0.2697	0.3117	0.2536
[Zn]_{BIOAC.}	0.3664	-0.0069	0.0941	0.9142
[Cd]_{BIOAC.}	0.2435	0.2068	0.9397	0.0849
[Pb]_{BIOAC.}	0.8698	0.1970	0.0954	0.3408
[Cu]_{BIOAC.}	0.7348	0.0151	0.0226	0.6160
Expl. Var.	4.9153	1.3817	1.2425	1.9110
Prp. Tot.	0.4915	0.1382	0.1242	0.1911

El *Factor 1*, es el que posee un mayor peso en el análisis factorial ya que explica el 70.41% de la varianza. Dicho factor relaciona, de forma inversa, la concentración de metales disueltos con la salinidad. Es decir, cuanto mayor sea la salinidad, menores concentraciones de Zn, Cd, Pb y Cu disueltos en el agua se registrarán. Este hecho es razonable, pues la inyección de metales al estuario se produce en el primer tanque del mismo, que es el que registra menor salinidad.

A su vez, los valores de Pb y Cu bioacumulados están relacionados de forma directa con la concentración de Pb y Cu disueltos en el agua. Un comportamiento similar es el que describen Amiard et al. (1987). Señalan que los estudios experimentales y de campo realizados por ellos sobre *Scrobicularia* plana y otras especies muestran que las concentraciones de los metales acumuladas en los organismos dependen principalmente de los niveles ambientales de dichos metales.

Por el contrario, el grado de bioacumulación de Zn y Cd es independiente de la salinidad y de la concentración de ambos metales disueltos. De hecho, no se correlacionan con ninguna otra variable en ninguno de los factores obtenidos.

Todos estos resultados concuerdan con los discutidos anteriormente en el apartado 6.3.2. de bioacumulación.

El *Factor 2* explica un 13.41% de la varianza total. Claramente, este factor relaciona, de forma directa, la concentración de metalotioneínas con la salinidad. No obstante, ambas variables conjuntamente están relacionadas de forma inversa con respecto al valor del factor 2.

En función de los datos de los que se dispone, en este experimento, la activación de la síntesis de metalotioneínas no tiene que ver con la concentración de metales pesados (disueltos o bioacumulados). Podría decirse que, en este bioensayo, una variable de tipo fisicoquímico, la salinidad, es la que controla la inducción de metalotioneínas. De hecho, existen trabajos en los que no se encuentra relación entre concentración de metalotioneínas y concentración de metales disueltos, como sucede en el caso del cangrejo *Pachygrapsus marmoratus* (Legras et al., 2000). Por el contrario, en otros trabajos sí se han encontrado relaciones directas entre variaciones de salinidad e inducción de metalotioneínas (e.g. Mouneyrac et al., 2001).

La suma de estos dos primeros factores explica el 83.8% de la varianza total, por lo que los dos factores restantes explican un porcentaje muy bajo de la misma, de ahí que tengan muy poca influencia a la hora de discutir el análisis estadístico. En cualquier caso, el *Factor 3* está relacionado con la concentración de Cd bioacumulado y, el *Factor 4*, con el Zn bioacumulado. Como ya se ha comentado, las concentraciones de Zn y Cd bioacumulados no están relacionadas con ninguna de las otras variables implicadas en el análisis. Al ser independientes aparecen solas en estos factores que explican un porcentaje de la varianza total muy bajo.

En la figura 6.6. se presenta la variación de estos cuatro factores con la salinidad. El Factor 1, a lo largo del gradiente de salinidad, evoluciona de tal manera que cada vez se hace más notoria la relación inversa entre concentración de metales disueltos y salinidad (esto es debido a que, conforme aumenta la salinidad, los tanques se alejan del punto de inyección de metales al estuario). Por su parte, el Factor 2, que relaciona inducción de metalotioneínas con salinidad de forma inversa, refleja fielmente la evolución de las metalotioneínas con la salinidad que se presenta en la figura 6.5.

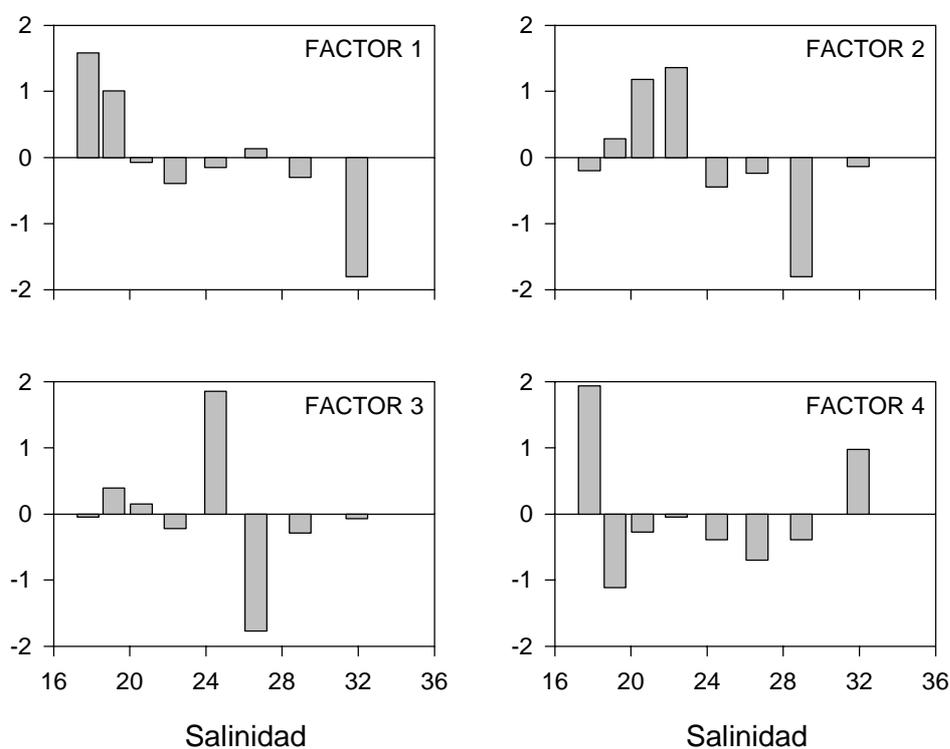


Figura 6.6. Variación con la salinidad de los cuatro factores extraídos en el tratamiento estadístico del experimento SIES 18.

En la figura 6.7. se representa la distribución de los distintos “casos” (representados por los tanques integrantes del simulador) frente a los “factores” 1 y 2, que son los más representativos del análisis estadístico.

El factor 1 podría identificarse como la “influencia de la salinidad sobre la concentración de metales disueltos”. Atendiendo a este factor puede verse que los dos casos extremos de comportamiento distinto están representados por los tanques 1 y 8. El tanque 2 se encuentra muy cercano al 1 en la gráfica, ya que ambos están muy cerca del punto de

entrada de metales al estuario. El resto de tanques se encuentran en una situación intermedia.

El factor 2 podría identificarse como la “influencia de la variable fisicoquímica salinidad sobre la inducción de metalotioneínas”. Con respecto a este factor, se encuentran estrechamente ligados a él los tanques del 3 al 7, poseyendo los tanques 3 y 4 un comportamiento opuesto al 5, 6 y 7. Como se reseñó anteriormente, el factor 2 está relacionado inversamente con el binomio “salinidad-inducción de metalotioneínas”. Entonces, cuando el factor 2 está por encima de cero, no se produce mucha inducción de metalotioneínas con la salinidad. Este sería el caso de los tanques 3 y 4. Por el contrario, cuando el factor 2 toma valores por debajo de cero, la inducción de metalotioneínas por efecto de la salinidad se acentúa. Este sería el caso de los tanques 5, 6 y 7. Si se observa la figura 6.5., se confirman estos resultados, ya que en los tanques 3 y 4 no se aprecia gran inducción de metalotioneínas y, a partir del tanque 5, se observa una marcada inducción de metalotioneínas con el incremento de salinidad hasta el tanque 7. En el tanque 8, la concentración de metalotioneínas vuelve a bajar, lo que es razonable si se observa su posición con respecto al factor 2 en la figura 6.7.: por debajo de cero, pero muy cercano a este valor.

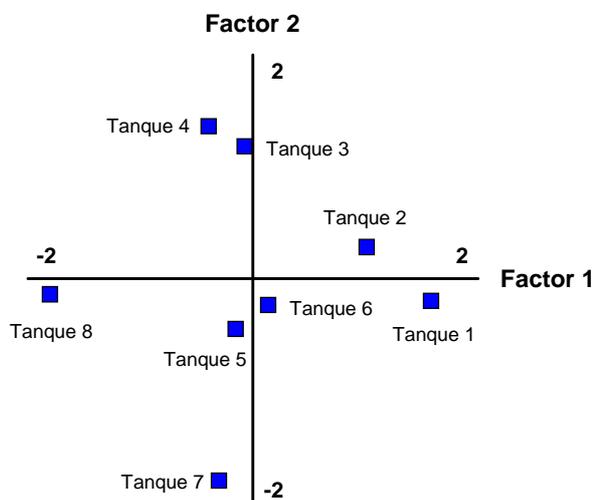


Figura 6.7. Representación gráfica de la distribución de los tanques integrantes del simulador en el espacio del Factor 1 frente al Factor 2.

A la vista de todos estos resultados podría concluirse que Pb y Cu se bioacumulan en el bioensayo descrito de acuerdo con la distancia que separa los distintos tanques del punto de inyección de metales (a más distancia, menor bioacumulación) y no por efecto de la evolución de la salinidad.

Por su parte, la bioacumulación de Zn y Cd se debe a otros factores diferentes a los incluidos en el tratamiento estadístico. Serían necesarios estudios futuros para concluir si este proceso de bioacumulación tiene que ver con la distinta especiación que sufren Zn y Cd en comparación con la que presentan Pb y Cu.

Por último, destacar que, en el bioensayo descrito en este capítulo, la inducción de metalotioneínas está directamente relacionada con la salinidad en lugar de con la concentración de metales en la fase disuelta.

6.4. BIBLIOGRAFÍA

Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Berthet, B., Metayer, C. 1987. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 106: 73-89.

Amiard-Triquet, C., Rainglet, F., Larroux, C., Regoli, F., Hummel, H. 1998. Metallothioneins in Arctic bivalves. *Ecotox. Environm. Saf.*, 41: 96-102.

Benoit, G., Otkay-Marshall, A., Cantu, A., Hood, E.M., Coleman, C.H., Corapcioglu, M.O., Santschi, P.H. 1994. Partitioning of Cu, Pb, Ag, Zn, Fe, Al y Mn between filter-retained particles, colloids, and solution in six Texas estuaries. *Mar Chem*, 45: 307-336.

Bilinski, H., Kozar, S., Plavsic, M., Kwokal, Z., Branica, M. 1991. Trace metal adsorption on inorganic solid phases under estuarine conditions. *Mar. Chem.*, 32: 225-233.

Blackstock, K.J. 1984. Biochemical metabolic regulatory responses of marine invertebrates to natural environmental change and marine pollution. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 22: 263-313.

Blake, W.H., Walsh, R.P.D., Barnsley, G.T., Palmer, G.T., James, J.G., Dyrinda, P.E.J., Shackley, S.E. 2001. Storm period behaviour of metals in the aqueous compartment of the Lower Swansea Valley.

Bryan, G. W. 1976. Heavy metal contamination in the sea. En: *Marine Pollution*, ed. Johnston, R., Academic Press, London, Chap. 3.

Bryan, G.W., Langston, W.J., Hummerstone, L.G. 1980. The use of biological indicators of heavy metals contamination in estuaries, with especial reference to an assessment of the biological availability of metals in estuarine sediments from South-West Britain. *Mar. Biol. Assoc. UK. (Occ. Pub.)*, 1.

Bryan, G.W., Langston, W.J., Hummerstone, L.G., Burt, G.R. 1985. A guide to the assessment of heavy-metal contamination in estuaries using biological indicators. *Mar. Biol. Ass. UK (Occ. Pub.)*, 4.

Cosson, R.P. 2000. Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limits and perspectives. *Cellular and Molecular Biology*, 46: 295-309.

Dai, M., Martin, J.M., Cauwet, G. 1995. The significant role of colloids in the transport and transformation of organic carbon and associated trace metals (Cd, Cu and Ni) in the Rhone delta (France). *Mar. Chem.*, 51:159-175.

DeValls, T.A., Forja, J.M., Gómez-Parra, A. 1998. An integrative assessment of sediment quality in two littoral ecosystems using Microtox and the rotifer *Branchionus plicatilis*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 16 (11): 2323-2333.

Duinker, J.C., Nolting, R.F. 1978. Mixing, Removal and Mobilization of Trace Metals in the Rhine Estuary. *Netherlands Journal of Sea Research*, 12:205-233.

Engel, D.W., Brouwer, M. 1991. Short-term metallothionein and copper changes in the blue crabs at ecdysis. *Biol. Bull.*, 180: 447-52

Flegal, A.R., Smith, G.J., Gill, G.A. 1991. Dissolved trace element cycles in the San Francisco Bay estuary. *Mar Chem*, 36: 329-363.

García-Luque, E., Forja, J.M., DeValls, T.A., Gómez-Parra, A. 2002. The behaviour of heavy metals from the Guadalquivir estuary after the Aznalcóllar mining spill: field and laboratory surveys. *Environ. Monitor. Assess.*, (En Prensa).

George, S.G. 1982. Subcellular accumulation and detoxification of metals in aquatic animals. En *Physiological mechanisms of marine pollutant toxicity*: 3-52. (Vernberg, W.B., Calabrese, A., Thurberg, F.P. y Vernberg, F.J., Eds). Academic Press, New York, London.

George, S.G., Wright, A.J., Carpena, E., Kindt, M. 2000. Kinetics and magnitude of metallothionein induction by Cd, Cu, Hg and Zn in European flounder calibration for environmental monitoring. *Marine Environmental Research*, 50: 12-24.

Geret, F., Cosson, R.P. 2000. Utilisation des métallothionéines comme biomarqueur de la contamination métallique: variabilité entre sites et organes chez l'huitre *Crassostrea gigas*. *Oceanologica Acta*, 23: 261-275.

Gómez-Parra, A., DelValls, T.A., Forja, J.M., Sáenz, I., Riba, I. 2000. Early contamination by heavy metals of the Guadalquivir estuary after the Aznalcóllar mining spill (SW Spain). *Mar. Pol. Bull.*, 40(12): 1115-1123.

Hogstrand, C., Haux, C. 1991. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein. *Compar. Biochem. Phys.*, 100C: 137-141.

Holliday, L.M., Liss, P.S. 1976. The behaviour of dissolved iron, manganese and zinc in the Beaulieu Estuary. En: *Estuarine Chemistry*. (Burton, J.D. y Liss, P.S., eds.). Academic Press, London. pp: 93-130.

Hylland, K., Haux, C., Hogstrand, C. 1992. Hepatic metallothionein and heavy metals in dab *Limanda limanda* from the German Bight. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91: 89-96.

Hylland, K., Nissen-Lie, T., Christensen, P.G., Sandvik, M. 1998. Natural modulation of hepatic metallothionein and cytochrome P4501A in flounder, *Platichthys flesus* L. *Mar. Environm. Res.*, 46: 1-5.

Kaegi, J.H.R., Schaeffer, A. 1988. Biochemistry of metallothionein. *Biochem.*, 27: 8509-8515.

Kägi, J.H.R., Vallee, B.L. 1960. *J.Biol. Chem.*, 235:3460.

Keegan, B.F. 1986. The COST 647 project on coastal benthic ecology: A perspective. *Hydrobiol.*, 142: ix-xii.

Kozar, S., Bilinski, H., Branica, M. 1992. Adsorption of lead and cadmium ions on calcite in the Krka estuary. *Mar Chem*, 40: 215-230.

Langston, W.J., Spence, S.K. 1995. Biological factors involved in metal concentrations observed in aquatic organisms. En: "Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems". Ed: Tessier, A., Turner, D.R. John Wiley & Sons.

Legras, S., Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S. 2000. Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors

(salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 246: 259-279.

Livingstone, D.R. 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J. Chem. Techn. Biochem.*, 57: 195-211.

Mantoura, R.F.C., Dickson, A., Riley J.P. 1978. The complexation of metals with humic materials in natural waters. *Estuar. Coast. Mar. Sci.*, 6: 387-408.

Margoshes, M., Vallee, B.L. 1957. *J. Am. Chem. Soc.*, 79: 4813.

McCarthy, J.F., Shugart, L.R. (Eds.)1990. Biomarkers of environmental contamination, Lewis Publishers, Boca Ratón.

Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C. 1998. Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in residents populations of oyster *Crassostrea gigas* from a polluted estuary. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 162, 125-135.

Mouneyrac, C., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., Rainbow, P.S. 2001. Comparison of metallothionein concentrations and tissue distribution of trace metals in crabs (*Pachygrapsus marmoratus*) from a metal-rich estuary, in a out of the reproductive season. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 129: 193-209.

Olafson, R.W., Olsson, P.E. 1991. Electrochemical detection of metallothionein. *Methods Enzymol.*, 205: 205-213.

Olsson, P.E., Haux, C. 1986. Increased hepatic metallothionein content correlates to cadmium accumulation in environmentally exposed perch (*Perca flviatilis*). *Aquat. Toxicol.*, 9: 231-242.

Olsson, P.E., Larsson, A., Haux, C. 1996. Influence of seasonal changes in water temperature on cadmium inducibility of hepatic and renal metallothionein in rainbow trout. *Mar. Environm. Res.*, 42: 41-44.

Roesijadi, G. 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.*, 22: 81-114.

Rotchell, J.M., Clarke, K.R., Newton, L.C., Bird, D.J. 2001. Hepatic metallothionein as a biomarker for metal contamination: age effects and seasonal variation in European flounders (*Pleuronectes flesus*) from the Severn Estuary and Bristol Channel. *Mar. Environm. Res.*, 52: 151-171.

Ruiz, J.M., Bryan, G.W., Wigham, G.D., Gibbs, P.E. 1995. Effects of Tributyltin (TBT) exposure on the reproduction and embryonic development of the bivalve *Scrobicularia plana*. *Mar. Environm. Res.*, 40(4): 363-379.

Sanz Perucha, R. 1993. Quimiometría ambiental. Gestión de las medidas contaminantes. Ministerio de Industria y Energía. 124 pp.

Simkiss, K., Mason, A.Z. 1983. Metal ions: metabolic and toxic effects . En: The Mollusca. Eds. Hochachka, P.W. Academic Press, New York, 2: 101-164.

Stegeman, J.J., Brouwer, M., Di Giulio, R.T., Förlin, L., Fowler, B., Sanders, B.M., Van Veld, P.A. 1992. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein synthesis as indicators of chemical exposure and effect. En: R.J., Huggett, R.A., Kimerle, P.M., Mehrle Jr., H.L. Bergman. Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress (pp: 235-335). Boca Raton, FL: Lewis Publishers.

Sulaiman, N., George, S., Burke, M.D. 1991. Assessment of sublethal pollutant impact on flounders in an industrialised estuary using hepatic biochemical indices. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 68: 207-212.

Sutherland, J., Major, C.W. 1981. Internal heavy metal changes as a consequence of exposure of *Mytilus edulis*, the blue mussel, to elevated external copper (II) levels. *Comp. Biochem. Physiol.*, 68C: 63-67.

Timbrell, J.A., Draper, R., Waterfield, C.J. 1994. Biomarkers in ecotoxicology: new uses for some old molecules?. *Toxicol. Ecotoxicol. News.*, 1:4-14.

Timbrell, J.A. 1998. Biomarkers of toxicology. *Toxicology*, 129: 1-12.

Tipping, E., Lofts, S., Lawlor, A.J. 1998. Modelling the chemical speciation of trace metals in the surface waters of the Humber system. *Sci. Tot. Environ.*, 210/211: 63-77.

Turner, D.R., Whitfield, M., Dickson, A.G. 1981. The Equilibrium Speciation of Dissolved Components in Freshwater and Seawater at 25°C and 1 atm Pressure. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45: 855-881.

Van Den Berg, C.M.G. 1991. Monitoring of labile copper and zinc in estuarine waters using cathodic stripping chronopotentiometry. *Mar Chem*, 34: 211-223.

Van Den Berg, C.M.G., Meijers, G.G.A., Van Der Heijdt, L.M., Zwolsman, J.J.G. 2001. Dredging-related mobilization of trace metals: a case study in the Netherlands. *Wat. Res.*, 35: 1979-1986.

Waldichuk, M. 1974. Some biological concerns in heavy metal pollution . En: Pollution and Physiology of marine organisms. Eds. Vernberg, F.J., Vernberg, W. B. Academic Press, New York, pp: 159.

Widdows, J., Donkin, P. 1991. Role of physiological energetics in ecotoxicology. *Comp. Biochem. Physiol.*, 100C: 69-75.

Windom, H., Byrd, J., Smith, R., Hungspreugs, M., Dharmvanij, S., Thumtrakul, W., Yeats, P. 1991. Trace metal-nutrient relationships in estuaries. *Mar Chem*, 32: 177-194.

Wood, T.M., Baptista, A.M., Kubawara, J.S., Flegal, A.R. 1995. Diagnostic modeling of trace metal partitioning in south San Francisco Bay. *Limnol. Oceanogr.*, 40(2): 345-358.

Zirino, A., Yamamoto, S. 1972. A pH dependent model for the chemical speciation of Koper, zinc, cadmium and lead in seawater. *Limnol. Oceanogr.*, 17: 661-671.

**7. COMPORTAMIENTO DE SULFONATOS DE
ALQUILBENCENO LINEAL (LAS) Y DE SUS
INTERMEDIOS DE DEGRADACIÓN (SPC) EN
ESTUARIOS**

7.1. INTRODUCCIÓN

7.1.1. LAS y SPC. Estructura

Existe un creciente interés por establecer el comportamiento ambiental (origen, transporte, distribución y transformación) de los compuestos orgánicos de síntesis. En este capítulo se ha realizado un estudio sobre los sulfonatos de alquilbenceno lineal (LAS), que son los tensioactivos aniónicos de mayor uso en los detergentes domésticos e industriales, y sobre sus intermedios de degradación: los ácidos sulfenilcarboxílicos (SPC).

El sulfonato de alquilbenceno lineal es, con un 12% del consumo mundial de tensioactivos, el más usado en la formulación de detergentes, tan sólo superado por los jabones (Berna y Cavalli, 1999). Este porcentaje aumenta si consideramos solamente los detergentes de uso doméstico, ya que, por ejemplo, su consumo en la Unión Europea constituyó, en 1998, el 27% del total. Durante ese mismo año, el consumo medio de LAS por habitante en la UE ascendió a $3.1 \text{ g (LAS)·día}^{-1}$ y, en España, $5 \text{ g (LAS)·día}^{-1}$ (Berna y Cavalli, 1999).

El LAS se introdujo a mediados de la década de los sesenta para sustituir a los alquilbencenos ramificados (tetrapropilbenceno sulfonatos, TBS) que, por su baja degradabilidad, ocasionaron numerosos problemas medioambientales. Desde entonces, su uso ha sido generalizado y también el interés de su estudio, por tratarse de una de las sustancias orgánicas xenobióticas de más amplia utilización a escala mundial ($2.2 \cdot 10^6 \text{ ton·año}^{-1}$, Berna y Cavalli, 1999).

La molécula de sulfonato de alquilbenceno lineal consta de un anillo bencénico al que están unidos un ión sulfonato y una cadena alquílica lineal en posición *para*. En el producto comercial, el número de carbonos de esta cadena varía desde 10 a 14. Cada uno de estos homólogos puede presentar, a su vez, diversos isómeros posicionales en función de la situación del enlace del grupo fenilo a la cadena hidrocarbonada. La nomenclatura de estos compuestos adopta la forma abreviada $m\phi C_n\text{-LAS}$, donde “n” es el número de átomos de carbono de la cadena alquílica y “m” identifica el átomo de carbono de la cadena alquílica donde se produce el enlace del grupo sulfofenilo. En la figura 7.1., se muestra un esquema de la estructura molecular de un isómero del LAS ($5\phi C_{11}\text{-LAS}$).

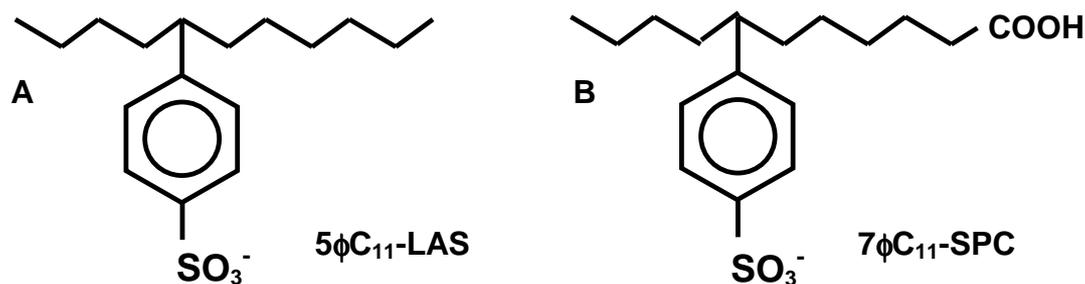


Figura 7.1. Estructura molecular de un isómero del sulfonato de alquilbenceno lineal (5φC₁₁-LAS) (A) y del ácido sulfofenilcarboxílico (7φC₁₁-SPC) (B).

La estructura de los ácidos sulfenilcarboxílicos (SPC), intermedios procedentes de la degradación primaria del LAS, es similar a la del LAS. La principal diferencia radica en la existencia de grupos ácidos en el extremo de la cadena alquílica como consecuencia de la oxidación del compuesto inicial. En la figura 7.1., se muestra el esquema de la estructura molecular de uno de los isómeros del ácido sulfenilcarboxílico de siete átomos de carbono en la cadena carboxílica (7φC₁₁-SPC).

7.1.2. Propiedades quimicofísicas del LAS

Las propiedades quimicofísicas de las moléculas de LAS y de SPC vienen determinadas por su estructura molecular. El LAS presenta un grupo no polar (cadena hidrocarbonada) y una parte polar (grupo sulfonato), es decir, una estructura anfifílica que le confiere su actividad superficial o tensioactiva. En disolución, las moléculas se concentran en la interfase aire-agua con el grupo hidrófilo orientado hacia la fase acuosa (figura 7.2.), o se asocian entre ellas, a partir de una determinada concentración (conocida como concentración micelar crítica, CMC), formando agregados moleculares (micelas, cristales líquidos liotrópicos o capas multimoleculares). Como consecuencia, se produce una reducción de la tensión superficial del disolvente; de ahí su utilidad como materia activa en la formulación de los detergentes. Este efecto se acentúa a medida que aumenta la longitud de cadena de los homólogos de LAS, y para un homólogo determinado es mayor cuando la unión al anillo bencénico se produce en los carbonos más alejados de los extremos de la cadena alquílica (Smith, 1997).

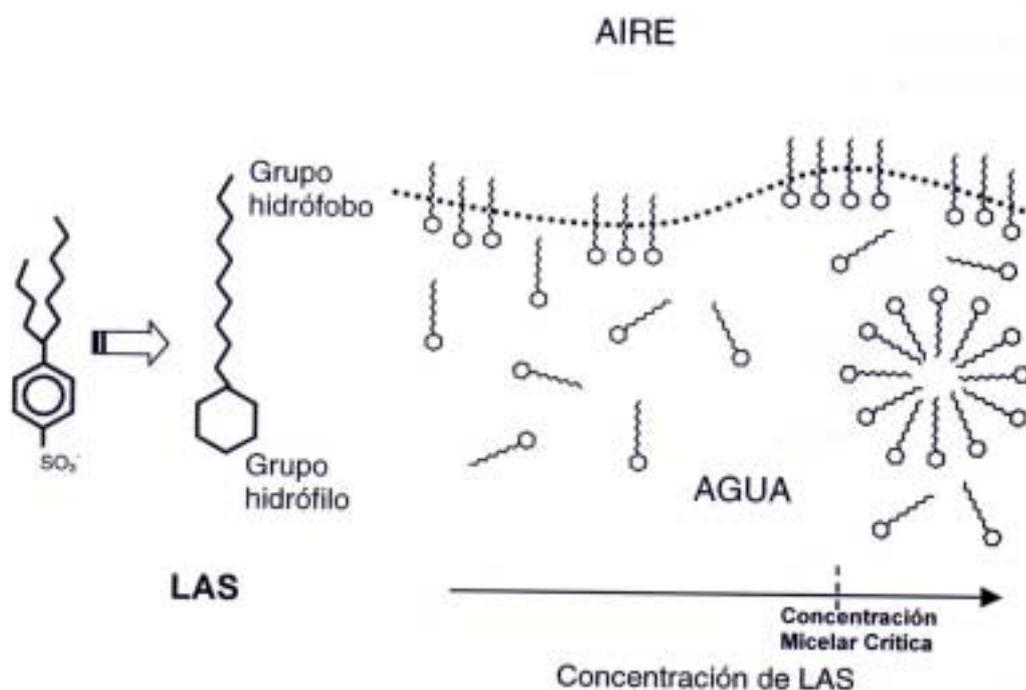


Figura 7.2. Esquema de la distribución del LAS en disolución y en la interfase agua-aire (adaptado de West y Harwell, 1992)

El LAS puede presentar interacciones hidrófobas a través de su cadena alquílica e interactuar, de forma electrostática, con moléculas o iones de carga positiva por el grupo sulfonato. En la Tabla 7.1. se recogen las principales características físico-químicas del LAS. Dicho LAS, en forma de sal sódica -como existe en el producto comercial- es una sustancia soluble en agua. La solubilidad disminuye con el aumento de la longitud de la cadena y, para un mismo homólogo, a medida que los isómeros son más internos (Smith, 1997). Su elevada afinidad por el medio acuoso es confirmada por su reducida presión de vapor, siendo prácticamente nula su vaporización hacia el aire (Folke y Landner, 2000).

El coeficiente de partición octanol-agua denota una cierta afinidad también por la materia orgánica, que aumenta con la longitud de la cadena alquílica. Esta propiedad es utilizada usualmente como un indicador de la afinidad de los contaminantes orgánicos por la fase sólida en los sistemas acuáticos (Amano et al., 1989).

Tabla 7.1. Principales propiedades físico-químicas del sulfonato de alquilbenceno lineal (modificada de León, 2001).

Propiedad	Valor	Referencia
Peso molecular medio	342 g·mol ⁻¹	Berna y Cavalli, 1999
C.M.C.	410 mg·L ⁻¹	Haigh, 1996
Punto de fusión	276.8 °C	
Punto de ebullición	637.4 °C	
Gravedad Específica	1.06 g·cm ⁻³	
Presión de Vapor (25°C)	1.28·10 ⁻¹⁴ mmHg	Berna y Cavalli, 1999
Log K_{ow}	2.0152	
Solubilidad NaLAS	250 g·L ⁻¹	
Solubilidad CaLAS₂	4 mg·L ⁻¹	

El LAS en forma de sal magnésica es más activo superficialmente, más soluble y más viscoso, más estable en aguas duras y presenta una menor CMC que el LAS cálcico. Por tanto, presenta un mayor poder humectante a durezas baja y media (Cohen et al., 1998). Un exceso de calcio o magnesio en el agua dará lugar a la formación de complejos con LAS poco solubles (Holmstrup y Krogh, 1999). En el caso del Ca(LAS)₂, su producto de solubilidad oscila entre 2.2·10⁻¹², para el C₁₀LAS y 9.0·10⁻¹⁴, para el C₁₄LAS (Verge et al., 2001)

7.1.3. Comportamiento de LAS en estuarios.

El comportamiento ambiental de cualquier contaminante orgánico viene dado, además de por su producción y consumo, por el binomio “transporte+reactividad”. Lo primero, por lo que afecta a la extensión espacial de su presencia en el medio y, lo segundo, porque determina su persistencia en la zona en la que ha sido vertido.

El estudio del transporte de un contaminante dado obliga a considerar los distintos procesos involucrados en su reparto en la lámina de agua, entre la fase disuelta y la fase sólida (sólidos en suspensión, ya sea material detrítico o microorganismos), y establecer las condiciones hidrodinámicas de la zona de estudio. En el caso de los tensioactivos, ha

de considerarse también su capacidad de incorporarse a la interfase agua-atmósfera, debido a que esta acumulación superficial puede afectar a su dispersión por mecanismos poco relevantes para otras sustancias que no presentan actividad superficial. Estas vías de transporte poco usuales están provocadas por la acción del viento sobre el movimiento de las monocapas superficiales, y sobre la formación de aerosoles y su posterior arrastre vía atmosférica. Sobre este particular, a pesar de que el LAS es una sustancia no volátil, se ha comprobado recientemente su inclusión en aerosoles marinos que se originan cuando se producen temporales en los lugares de la costa en que se generan vertidos residuales que contienen este tensioactivo (Bayona, comunicación personal).

La característica de ser superficialmente activos obliga también a considerar de una manera especial la toma de muestras en el estudio del comportamiento ambiental de estos compuestos y en los ensayos que se realicen con ellos en el laboratorio.

En relación con la reactividad de los contaminantes orgánicos deben tenerse en cuenta los distintos procesos por los que se produce su eliminación del medio: su destrucción físico-química, provocada fundamentalmente por la acción de la radiación ultravioleta, la biodegradación y la bioacumulación. En una consideración sumaria de la bibliografía disponible, puede concluirse que la biodegradación del LAS es, con diferencia, el principal mecanismo empleado en su desaparición de los sistemas estuáricos. Una consideración detenida de esta cuestión merece que se tenga en cuenta la velocidad con que se produce en función de las condiciones fisicoquímicas del medio en los distintos compartimentos ambientales en los que tiene lugar la acumulación.

Así, el LAS presenta un comportamiento no conservativo tanto en estuarios (Stalmans et al., 1991; Takada y Ogura, 1992; Matthijs y Stalmans, 1993; Marcomini et al., 2000) como en el medio marino (González-Mazo et al., 1998). En estos sistemas, por tanto, desciende la concentración de LAS de manera más acusada de lo que cabría esperar debido simplemente al proceso de dilución. En este sentido, Takada y Ogura (1992) calificaron a los estuarios como barreras eficientes a la entrada de LAS al medio marino. Los procesos de adsorción y precipitación son más intensos que en el medio continental, y la biodegradación es más lenta y menos extensa que en agua dulce (Terzic et al., 1992). La adsorción sobre el material particulado está favorecida por el aumento de la fuerza iónica (Amano et al., 1992; González-Mazo et al., 1996); la precipitación aumenta con la concentración de Ca^{2+} (10^{-2}M en agua de mar, Cohen et al., 1993) y los

microorganismos del medio marino son menos activos en la biodegradación que los del agua dulce (Larson et al., 1993).

Las concentraciones de LAS presentan una elevada variabilidad (Tabla 7.2.) como consecuencia de los distintos procesos que favorecen su eliminación a lo largo del estuario. Takada y Ogura (1992) caracterizaron la distribución de LAS en agua, sólidos en suspensión y sedimentos a lo largo del estuario del Tamagawa (Japón). Las concentraciones disminuyen hacia el mar en las tres fases, especialmente durante los meses de verano, en los que se degrada todo el LAS que accede al estuario.

Tabla 7.2. Niveles de LAS en agua ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), sólidos en suspensión (S.S.) ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) y sedimento ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en diferentes sistemas estuáricos reales (modificada de León, 2001).

Fase	Estuario	[LAS]	Referencia
Agua ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Barbate	6.1 - 9.8	González-Mazo et al., 1997a
	Scheldt	<0.5 – 9.4	Matthijs y Stalmans, 1993
	Laguna Venecia	1.3 – 256	Marcomini et al., 2000
	Krka	0.9 – 391	Terzic y Ahel, 1994
	Tamagawa	8.1 – 444	Takada y Ogura, 1992
S.S. ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Tamagawa	3 – 704	Takada y Ogura, 1992
	Varios japoneses	4.82±7.36	Takada e Ishiwatari, 1991
Sedimento ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Tamagawa	0.5 – 24	Takada y Ogura, 1992
	Tamagawa	0.12 – 45.1	Takada et al., 1992b
	Barbate	0.44 – 0.83	González-Mazo et al., 1997a

También se ha observado un aumento de la concentración de LAS en la fase acuosa durante la estación fría, debido a la reducida actividad microbiana (Amano et al., 1991; Takada et al., 1992a; Marcomini et al., 2000). Por tanto, el flujo de LAS hacia la zona costera depende de la época del año que se considere. Así, Takada et al. (1992a) obtuvieron para el estuario del Tamagawa un flujo cinco veces superior en invierno que en verano. Sin embargo, en seguimientos a largo plazo (Kilikidis et al., 1992; Schröder, 1995; González-Mazo et al., 1998), las variaciones detectadas en la concentración de LAS se atribuyen principalmente a la influencia de la marea y a la entrada de LAS al

sistema en función del momento del día o de la semana (Quiroga et al., 1989; González-Mazo et al., 1998)

Los elevados coeficientes de partición sedimento-agua detectados, que variaron entre 500 y 7000 L·Kg⁻¹ en estuarios (Terzic y Ahel, 1994), y entre 3000 y 13000 L·Kg⁻¹ en el medio marino (González-Mazo et al., 1998), muestran la gran capacidad de adsorción del LAS sobre el material particulado. Al igual que en los sistemas continentales, se ha detectado la adsorción preferencial sobre el sedimento de los homólogos más hidrófobos (Takada et al., 1992a; Terzic y Ahel, 1994; González-Mazo, et al., 1998). En las proximidades del vertido, los sedimentos contienen mayor proporción de homólogos de cadena más larga (C₁₂ y C₁₃), detectándose incluso el C₁₄ LAS (Terzic y Ahel, 1994; González-Mazo et al., 1998, 1999), que constituye menos del 0.5% en el LAS comercial y, a medida que aumenta la distancia al punto de vertido, disminuye el porcentaje de homólogos de mayor peso molecular. En la bahía de Tokio el contenido de LAS en los sedimentos es muy bajo (<0.01 µg·g⁻¹) y, sin embargo, en otras zonas costeras, como la bahía de Cádiz, las concentraciones de LAS son de varias decenas de ppm (González-Mazo et al., 1998). La diferencia en la concentración de LAS detectada en ambas bahías se debe a las diferentes rutas de acceso del LAS al medio (e.g., eliminación de gran parte del LAS en el estuario antes de acceder a la bahía de Tokio, comparado con el vertido directo -sin tratamiento previo- en la bahía de Cádiz); y a las características propias de cada zona, principalmente con respecto a la granulometría del sedimento y a la salinidad del agua. La proporción de LAS retirado de la columna de agua por adsorción depende del contenido en sólidos en suspensión, de la fuerza iónica y de la hidrodinámica de la zona. En el estuario del Tamagawa, el 10% del LAS detectado estaba adsorbido; sin embargo, se encontraron mayores porcentajes para otros sistemas (11-60%) (Terzic y Ahel, 1994; González-Mazo et al., 1998).

De lo anteriormente expuesto, se desprende que los sedimentos son los receptores últimos del LAS no degradado. En la capa superficial, donde las condiciones son aerobias, continúa la degradación (Amano et al., 1992; Reiser et al., 1997) y, cuando las condiciones son anóxicas, el proceso no tiene lugar (Federle y Schwab, 1992). En lo que respecta a los SPC, en la actualidad, se dispone de muy pocos estudios sobre la distribución de los mismos en agua de mar (González-Mazo et al. 1997a; Marcomini et al., 2000; León et al., 2002). También se ha realizado algún estudio sobre la caracterización de SPC en ensayos de laboratorio (e.g., Knepper y Kruse, 2000 y León, 2001).

7.1.4. Biodegradación de LAS

El sulfonato de alquilbenceno lineal está considerado como un compuesto biodegradable por la alta tasa de degradación alcanzada en distintos sistemas (Larson et al., 1993; Moreno et al., 1998; Vives-Rego et al., 2000). Sin embargo, se han encontrado concentraciones apreciables de LAS y la presencia de intermedios de degradación en los efluentes de las plantas de tratamiento, así como una acumulación de LAS en los lodos de los digestores anaerobios y en sedimentos de sistemas de agua dulce y marinos.

La degradación del LAS comienza en la propia red de saneamiento de las poblaciones, en las que se elimina entre un 12% y un 60% (Moreno et al., 1990; Cavalli et al., 1993). Buena parte del LAS presente en el agua residual está asociado a los sólidos en suspensión (60-70%, en Cavalli et al., 1993), hecho que puede reducir su biodisponibilidad y, por tanto, su biodegradación. Aún en estas condiciones, la eliminación en las plantas depuradoras de aguas residuales con tratamiento terciario supera el 85% (Holt et al., 1998).

La biodegradación en el medio natural debe ser estudiada con mayor detenimiento, ya que todavía existen numerosos vertidos que se realizan sin tratamiento previo. En general, los niveles de LAS encontrados en el medio marino son bajos, tanto en fase disuelta como en los sólidos en suspensión y en los sedimentos, por lo que puede inferirse que la degradación tiene lugar en una gran extensión. No obstante, en algunos lugares que reciben aguas residuales urbanas sin tratar se ha apreciado un aumento progresivo de su concentración, por lo que puede admitirse que la velocidad del proceso no debe ser elevada. De hecho, en determinados sistemas se han detectado concentraciones significativas de LAS (Painter y Zabel, 1989), especialmente en las aguas costeras y estuáricas (González-Mazo et al., 1997b; 1998), que son las más productivas y también las más sensibles en lo que respecta a su actividad biológica.

a) Mecanismo de biodegradación de LAS

La degradación del LAS transcurre en dos etapas, una inicial y rápida en la que se altera la estructura del compuesto y pierde algunas propiedades fisicoquímicas (tensioactividad), denominada biotransformación o biodegradación primaria, y otra posterior en la que se produce su mineralización. Esta última etapa implica la descomposición completa de la molécula de LAS en CO₂, agua y sulfato.

La ruta de biodegradación aerobia del LAS comúnmente aceptada comienza con una ω -oxidación del grupo metilo terminal de la cadena alquílica, de la que se obtiene la formación sucesiva de un alcohol, un aldehído y un ácido sulfofenilcarboxílico (Huddleston y Allred, 1963). A continuación, la cadena sufre una β -oxidación por la que se eliminan secuencialmente dos unidades de carbono como Acetil Co~A (Huddleston y Allred, 1963). Los organismos aerobios desarrollan la β -oxidación generando los correspondientes SPC hasta el carbono terciario, que impide la continuación del proceso (White y Russel, 1994). La degradación continúa con la desulfonación y la ruptura del anillo aromático. Por último, las moléculas resultantes se mineralizan o se incorporan a la biomasa celular de los organismos responsables de la degradación.

b) Estudios de biodegradación en laboratorio

Desde un punto de vista medioambiental, los ensayos de biodegradación pueden clasificarse en: ensayos no representativos desde una óptica ambiental, que se realizan generalmente a altas concentraciones, para evaluar la degradación del LAS durante el tratamiento de aguas residuales o facilitar el estudio de la naturaleza del proceso, y ensayos ambientalmente representativos que se desarrollan partiendo de concentraciones de LAS ($1-2000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y condiciones ambientales similares a las detectadas en el medio. Hasta el momento, la mayor parte de los ensayos corresponde a la primera categoría, ya que se requieren técnicas más precisas para abordar experimentos a concentraciones inferiores a $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. En cualquier caso, los datos obtenidos en el laboratorio son difíciles de extrapolar al medio natural debido a las numerosas variables que inciden sobre el proceso de biodegradación.

Los reactores que se suelen utilizar son estáticos (Vives-Rego et al., 2000), para ensayos en los que no hay intercambios con el exterior, o bien de flujo continuo (Hrsak et al., 1976; Jiménez et al., 1991; Konopka et al., 1996). Estos últimos son capaces de simular mejor las condiciones ambientales al contemplar en su dispositivo la renovación del sistema, pero también dificultan la modelación del proceso de biodegradación al aumentar el número de variables implicadas.

La caracterización de la degradación del LAS y la formación de sus intermedios de degradación debe realizarse usando técnicas de análisis específicas que permitan la identificación y cuantificación de cada uno de sus intermedios. La mineralización del LAS está limitada por la ruptura del anillo aromático (Larson, 1990), por lo que la desaparición

de los SPC puede establecerse como criterio específico de mineralización para este compuesto, si no se dispone de compuestos marcados por isótopos radiactivos.

7.1.5. Adsorción de LAS

El comportamiento y el destino de las sustancias orgánicas en el medio acuático vienen condicionados, en gran medida, por su capacidad de adsorción. La extensión con la que se produce este proceso determina, en último término, su distribución entre los distintos compartimentos ambientales y, con ello, su transporte, reactividad y biodisponibilidad. La adsorción afecta de forma especial a las sustancias con carácter tensioactivo, como es el caso del LAS, que presenta una acusada tendencia a acumularse en las interfases, especialmente en la que presentan los sedimentos en suspensión (Ferrer et al., 1997; González-Mazo et al., 1998). Las características de su adsorción han sido estudiadas tanto en aguas continentales (Matthijs y De Henau, 1985) como marinas (Rubio et al., 1996). En agua de mar, donde la solubilidad del LAS es menor debido a la elevada concentración de Ca^{2+} existente (Cohen et al., 1993), se ha puesto de manifiesto que la adsorción aumenta de manera muy acusada con la salinidad (Rubio et al., 1996). Eso supone una importante diferencia entre el comportamiento del LAS en los sistemas acuáticos continentales y costeros. Además, los procesos que ocurren en el ambiente de manera simultánea a la adsorción (principalmente biodegradación en la columna de agua y precipitación) influyen también sobre la distribución de LAS entre ambas fases.

En general, los coeficientes de partición del LAS en el medio ambiente son elevados (González-Mazo et al., 1998), lo que muestra una clara afinidad del tensioactivo por la fase sólida en suspensión. Los valores obtenidos en la columna de agua (sólidos en suspensión/agua) son superiores, incluso en dos órdenes de magnitud, a los obtenidos en sedimento (sedimento/agua intersticial). De ahí que el transporte de LAS se produce en gran medida asociado al material particulado.

Si bien la adsorción del LAS se ha estudiado prolijamente tanto en aguas continentales (e.g. Matthijs y De Henau, 1985) como en plantas de tratamiento de aguas residuales (e.g. Prats et al., 1993), en el medio marino ha recibido una menor atención (e.g. Rubio et al., 1996). La caracterización de este proceso es de especial relevancia teniendo en cuenta que está claramente relacionado con la biodisponibilidad del tensioactivo, que podría verse reducida debido a la adsorción (Giger et al., 1989).

7.2. MATERIAL Y MÉTODOS

7.2.1. LAS comercial empleado

El índice activo y la distribución de homólogos de LAS (expresados ambos en porcentaje) utilizados en los ensayos de biodegradación se indican en la Tabla 7.3. Todos los homólogos de LAS han sido suministrados por Petroquímica Española S.A.

Tabla 7.3. Composición del sulfonato de alquilbenceno lineal empleado en todos los ensayos descritos en esta Memoria: Na LAS P550. (Pureza: 99.2%)

Ph C10	Ph C11	Ph C12	Ph C13	Ph C14	<5 Ph C10	2Ph Alcano	Parafinas	Índice Activo	P.M.
8.4	38.3	33.6	17.9	1.0	0.8	15.6	0.1	10%	240.5

7.2.2. Métodos analíticos

a) Análisis de LAS y SPC por HPLC

El equipo de análisis consta de un cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC HP 1050), equipado con un detector de fluorescencia ($\lambda_{ex}=225$ nm, $\lambda_{em}=295$ nm). Los homólogos de LAS y SPC se separaron usando una columna Lichrosorb RP-8 de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 10 μ m (Teknokroma). El volumen de inyección para todas las muestras fue generalmente de 100 μ L, que se pincharon por medio de un inyector automático (HP 1100). La cuantificación de las muestras se realizó usando unos patrones externos (LAS y/o SPC en agua de mar), tratados siguiendo el mismo procedimiento analítico que las muestras.

El gradiente de elución utilizado está basado en métodos descritos anteriormente (Cavalli, et al. 1996; González-Mazo et al., 1997a), pero presenta importantes modificaciones (emplea metanol en lugar de acetonitrilo; disminuye la concentración de hidrogenosulfato de tetraetilamonio y cambia las proporciones de los eluyentes).

En los casos en los que ha sido necesario validar la asignación de los picos obtenida con el procedimiento anterior, se ha aplicado la cromatografía líquida con espectrometría de masas (MS); (ver apartado 2.4. de esta misma sección).

b) Pretratamiento de las muestras sólidas (extracción SOXHLET)

La técnica de extracción Soxhlet que presenta elevadas recuperaciones para el LAS (González-Mazo et al., 1998) ha sido utilizada para la extracción simultánea de LAS y SPC de muestras sólidas. Alrededor de unos 3 gramos de sedimento atrapado/retenido en filtros AP-40 se colocaron en cartuchos de extracción Soxhlet, previamente lavados con metanol (3 h). La extracción se realizó con 60 mL de metanol durante 12 horas. Los extractos metanólicos se llevaron a sequedad con un rotavapor y el residuo se redisolvió en 200 mL de agua tibia (50-55°C) con la ayuda de un baño de ultrasonidos. Los extractos acuosos finales se sometieron al tratamiento de extracción en fase sólida que se describe en el siguiente apartado de la Memoria.

c) Extracción en fase sólida

El proceso de extracción en fase sólida se ha desarrollado en una unidad Adsorbex SPU de 24 canales.

El método de extracción en fase sólida propuesto por González-Mazo y Gómez-Parra (1996) presenta buenas recuperaciones para el LAS, pero no para los SPC de cadena corta. No obstante León, (2001) optimizó el método de extracción para ambos tipos de compuestos. Finalmente, el protocolo de trabajo quedó establecido como sigue:

El método de preconcentración y purificación de LAS y SPC requiere el uso de dos minicolumnas: la primera, una Bond Elut C₁₈ y, la segunda, una SAX. Ambas son activadas previamente lavándolas sucesivamente con metanol (10 mL) y agua (10 mL). Se adiciona a la muestra cloruro sódico hasta alcanzar una fuerza iónica de 5 M y dihidrogenofosfato de potasio (0.05 M). Se acidifica con ácido ortofosfórico (pH=1.5) y se pasa a través de una minicolumna Bond Elut C₁₈ a unos 2 mL·min⁻¹. Esta minicolumna se lava con 1 mL de agua (pH neutro) y se eluye con 10 mL de metanol. Se pasan 100 mL de disolución (extracto anterior + 90 mL de agua) a través de la minicolumna de intercambio aniónico (SAX), que posteriormente se lava con 1 mL de agua (2% ácido acético) y se eluye con 3 mL de metanol (2N HCl). El extracto final es evaporado con corriente de nitrógeno y calor (temperatura inferior a 45°C), y se redissuelve con 1 mL MeOH/H₂O (80/20). En la figura 7.3. se presenta un esquema del dispositivo experimental reseñado.

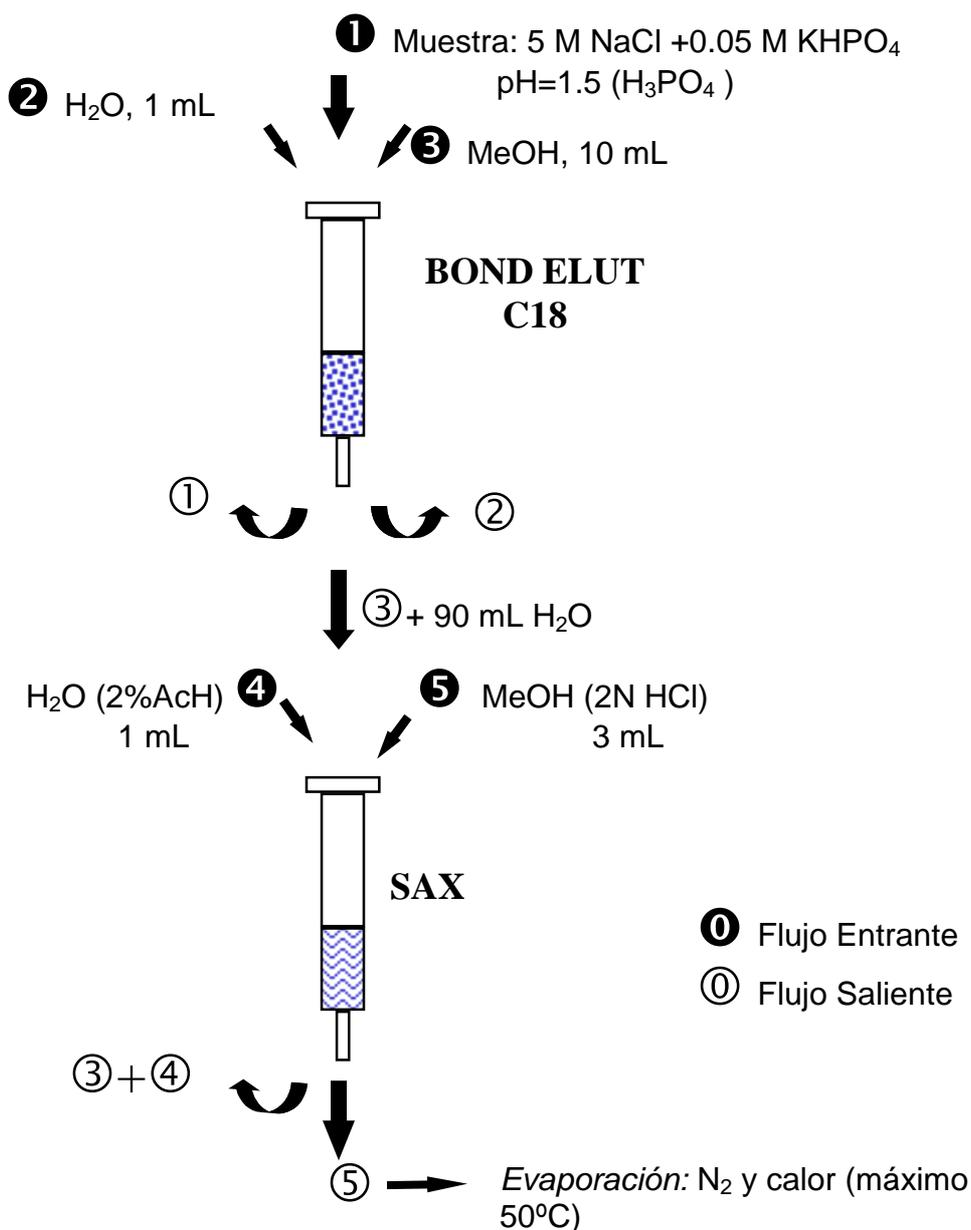


Figura 7.3. Esquema general del proceso de extracción en fase sólida empleado (tomado de León, 2001).

d) Espectrometría de masas

Esta técnica ha sido especialmente útil para la determinación inequívoca del $\text{C}_7\text{-SPC}$ del que no se disponía de un patrón, y corroborar la asignación del resto de los intermedios de degradación, especialmente en muestras procedentes de los ensayos de biodegradación.

Estos análisis se han realizado utilizando el equipo HPLC/MS de los Servicios Centrales de Ciencia y Tecnología de la Universidad de Cádiz y las condiciones aplicadas han sido las propuestas por González-Mazo et al., (1997a). Este método consiste en un régimen de separación en gradiente con una disolución de agua (A) y AcN/H₂O (80:20) (B), ambas con 5 mM de trietilamina y 5 mM de ácido acético, y una columna C₁₈ Hypersil 250x2 mm (5 µm de tamaño de partícula) como fase estacionaria. Se ha aplicado un flujo de 0.1 mL·min⁻¹ y un gradiente prácticamente lineal desde 5%A+95%B a 100%A en 40 minutos, manteniendo esta proporción hasta los 65 minutos de análisis.

7.2.3. Ensayos realizados

Uno de los objetivos perseguidos en este trabajo ha sido la caracterización del comportamiento de un tensioactivo aniónico durante su tránsito por un estuario. En concreto, el sulfonato de alquilbenceno lineal (LAS).

Se han realizado cinco experimentos encaminados a estudiar dos aspectos distintos del comportamiento del LAS: su adsorción y su biodegradación.

Concretamente, SIES 13 consistió en un ensayo enfocado al estudio de la adsorción de LAS a lo largo de un gradiente de salinidad comprendido entre 0 y 36.

Para la caracterización de la biodegradación de LAS a tres salinidades distintas, se diseñaron SIES 14, 15 y 16.

Por último, en SIES 17 se pretendió estudiar ambos fenómenos de forma conjunta a lo largo de un gradiente de salinidad completo (entre 2.5 y 37).

El diseño y las características de estos cinco experimentos han sido detallados prolijamente en el apartado 2.4. del Capítulo 2.

7.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.3.1. Optimización del diseño experimental

En el primer experimento de los dedicados a la caracterización del comportamiento del LAS (SIES 13), se realizó una primera aproximación para simular la entrada de LAS al sistema, que consistió en incluirlo en el propio tanque que abastecía al simulador de agua

de río. De esta forma, el LAS accedía al primer tanque del equipo disuelto en el agua de río.

Además, se pretendía trabajar con concentraciones de LAS similares a las registradas en sistemas naturales, por lo que se disolvió la cantidad de LAS suficiente con objeto de alcanzar una concentración de $200 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ en el tanque de agua de dulce.

El uso de un tanque de gran volumen posee claras ventajas para la simulación de condiciones ambientales, ya que permite muestrear mayores volúmenes y reducir, por tanto, el límite de detección. Por otra parte, también presenta inconvenientes, como la homogenización completa del agua contenida en dicho tanque de grandes dimensiones (que se resolvió empleando varias bombas de recirculación de agua de elevado caudal). Pero el principal problema que se registró en dicho tanque de gran volumen fue la detección de pérdidas importantes en la concentración de LAS disuelto por adsorción en las paredes de dicho tanque. Por otra parte, era muy probable también la aparición de biodegradación.

Debido a todos estos inconvenientes, se decidió cambiar en el resto de experimentos (desde SIES 14 hasta SIES 17) la forma de acceso de LAS al sistema. Así, se preparó una disolución aparte en una botella de vidrio de 5 L de capacidad, de tal forma que el LAS accediera en continuo, por medio de una bomba peristáltica, directamente al primer tanque del simulador. En este nuevo recipiente se comprobó que las pérdidas por adsorción fueron inferiores al 5% en todos los casos. A fin de minimizar las posibles pérdidas de LAS por biodegradación y adsorción, la concentración de la disolución originaria de LAS que se preparaba en todos los experimentos osciló entre valores de 100 y $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, si bien al primer tanque (tras realizar los cálculos de dilución adecuados), accedía una cantidad dos órdenes de magnitud inferior, buscando valores más acordes a las concentraciones ambientales que se registran para este tensioactivo.

A pesar de todos los inconvenientes que se presentaron en el primer experimento (SIES 13) debido a una elección inadecuada del sistema de acceso de LAS al sistema, al término de dicho ensayo se midieron las concentraciones de LAS tanto en fase disuelta como asociado a material particulado a lo largo del gradiente de salinidad, como una primera aproximación al comportamiento estuárico del LAS.

Los resultados obtenidos (figura 7.4.) muestran cómo casi la práctica totalidad del LAS que accede al estuario se asocia al material particulado, decreciendo la cantidad a medida que los tanques se alejan del hipotético punto de vertido. Así, existe una

diferencia de tres órdenes de magnitud entre lo que se detecta en fase disuelta (entre 0.08 y 3.9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y lo que se asocia a los sólidos en suspensión (0.32 y 30.56 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). Este hecho es razonable, dada la adsorción preferencial que presenta el LAS sobre el material particulado, sobre todo la de los homólogos más hidrófobos que son los que poseen mayor longitud de cadena alquílica (Takada et al., 1992a; Terzic y Ahel, 1994; González-Mazo, et al., 1998).

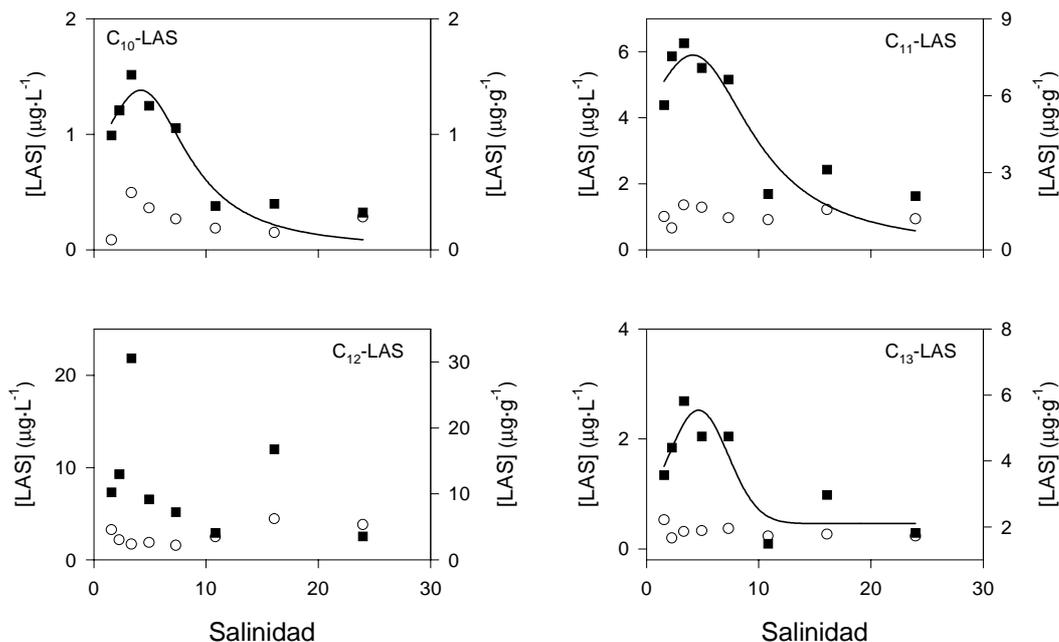


Figura 7.4. Variación con la salinidad de la concentración de LAS adsorbido al material particulado (■ eje de ordenadas de la derecha) y LAS en la fase disuelta (○ eje de ordenadas de la izquierda) para los cuatro homólogos de LAS en el ensayo SIES 13.

También se presenta la variación con la salinidad de las proporciones (en %) de los homólogos de LAS asociados a material particulado en SIES 13 y en la fase disuelta frente a las proporciones que presentan los cuatro homólogos en la formulación de LAS comercial empleada (figuras 7.5. y 7.6., respectivamente). En la primera, se observa cómo la proporción de los homólogos de cadena larga (C₁₂-LAS y C₁₃-LAS, los más hidrófobos) se encuentra, en todos los tanques, por encima de la proporción de la formulación comercial. Por el contrario, los homólogos de cadena corta (C₁₀-LAS y C₁₁-LAS) se encuentran, a lo largo de todo el gradiente de salinidad, por debajo de la proporción comercial empleada.

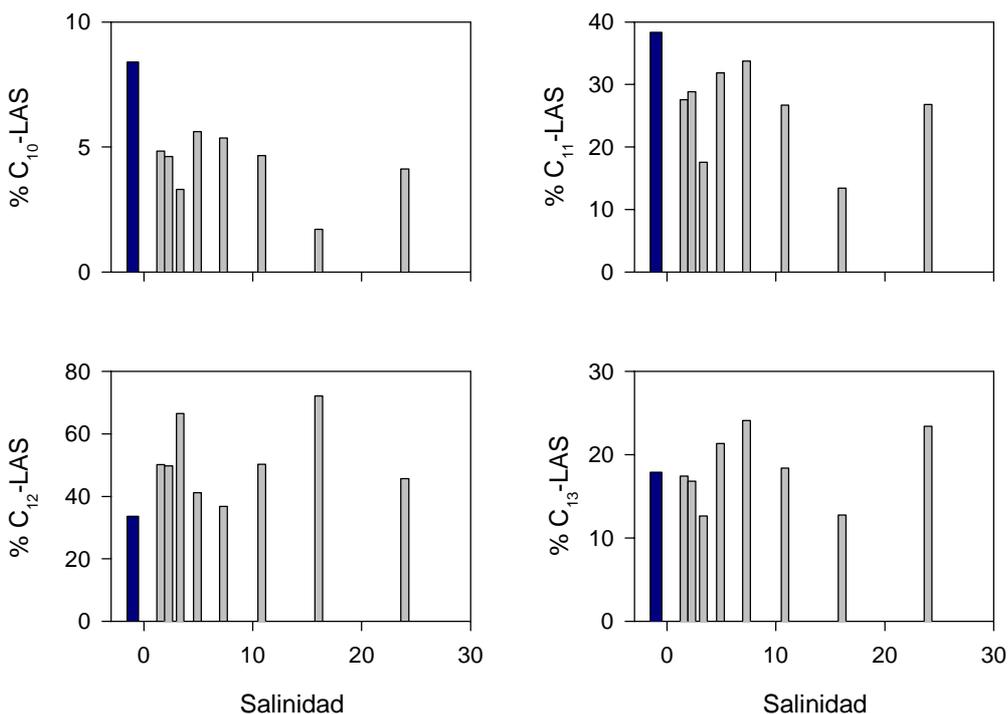


Figura 7.5. Variación con la salinidad del porcentaje de homólogos de LAS adsorbidos a material particulado en SIES 13. En cada gráfica, la barra oscura de la izquierda indica el porcentaje de cada homólogo en la formulación de LAS comercial empleado.

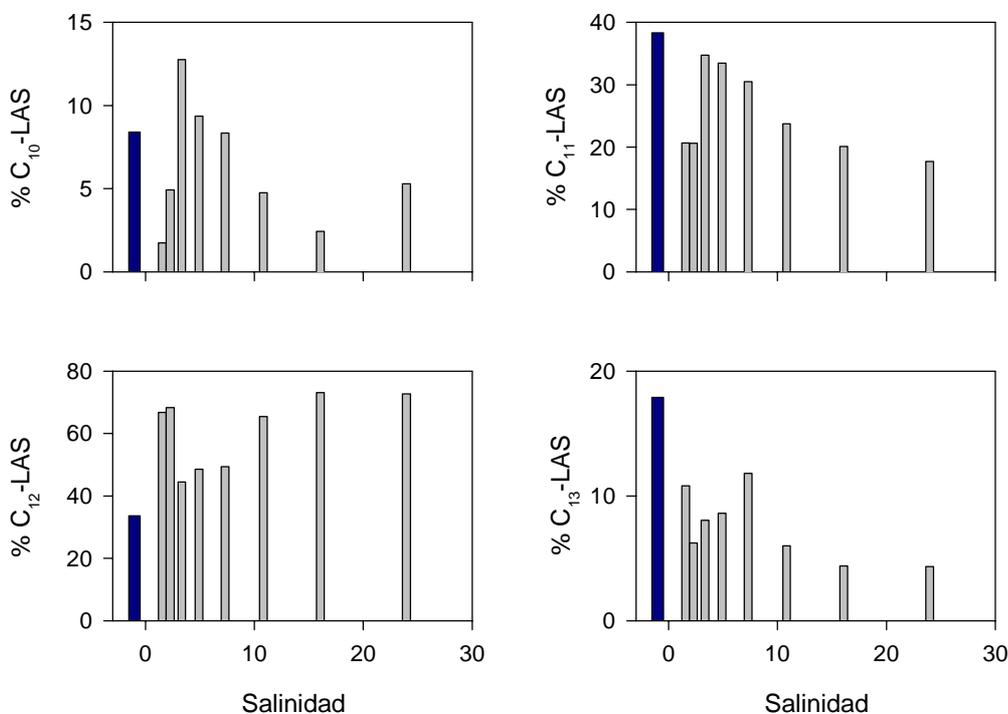


Figura 7.6. Variación con la salinidad del porcentaje de homólogos de LAS disuelto en SIES 13. En cada gráfica, la barra oscura de la izquierda indica el porcentaje de cada homólogo en la formulación de LAS comercial empleado.

De la misma forma, en la figura 7.6., no se observa ninguna tendencia significativa con respecto al incremento de la fuerza iónica en cuanto a las distintas proporciones de los homólogos en la fase disuelta. Esto puede atribuirse a las bajas concentraciones de LAS detectadas. Por otra parte, al igual que señalan León et al. (2002), a lo largo de todo el gradiente de salinidad los homólogos C₁₁-LAS y C₁₂-LAS fueron los más abundantes.

7.3.2. Ensayos de Biodegradación de LAS

a) Comportamiento del LAS

La determinación de la concentración de LAS y la detección y cuantificación de sus intermedios de degradación (SPC) en los distintos tanques integrantes de los experimentos SIES 14, 15 y 16, se realizó mediante cromatografía líquida de alta resolución empleando un detector de espectrometría de masas y un detector de fluorescencia. Los resultados obtenidos mediante ambos detectores fueron muy similares como se observa en la figura 7.7., donde se presenta, a modo de ejemplo, la variación de la concentración de los cuatro homólogos de LAS a lo largo de los tanques del equipo en el ensayo SIES 16 determinada mediante los dos tipos de detectores.

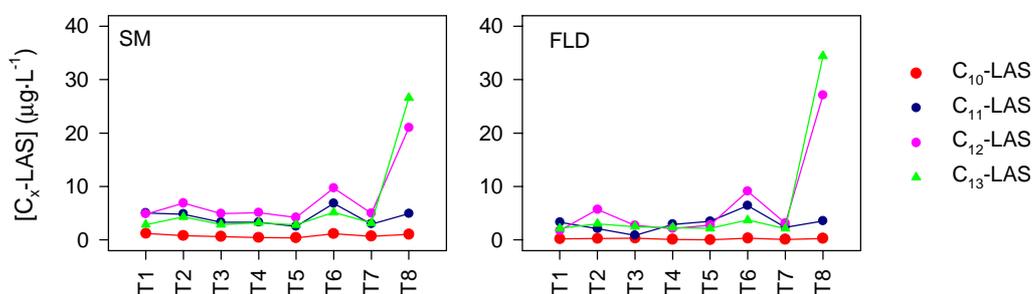


Figura 7.7. Concentración de los homólogos del LAS a lo largo de los tanques del simulador en SIES 16 determinada mediante cromatografía líquida con detector de espectrometría de masas (SM) y con detector de fluorescencia (FLD).

La concentración de LAS que entraba en continuo en SIES 14 fue superior, en un orden de magnitud, a la que entraba en SIES 16. No obstante, ambos valores están lo suficientemente próximos a concentraciones ambientales como para poder comparar las tendencias conjuntamente.

En lo que respecta a la evolución de la concentración de los cuatro homólogos de LAS en los tres ensayos, se observa cómo existe una elevada tasa de biodegradación en todos

los casos (es decir, a las tres salinidades ensayadas) (figura 7.8.). De hecho, se observa un fuerte descenso de la concentración de tensioactivo desde el primer tanque y, a partir del segundo, prácticamente todo el LAS se ha biodegradado (el porcentaje de biodegradación es superior al 95.7%, como se presenta en la Tabla 7.4.).

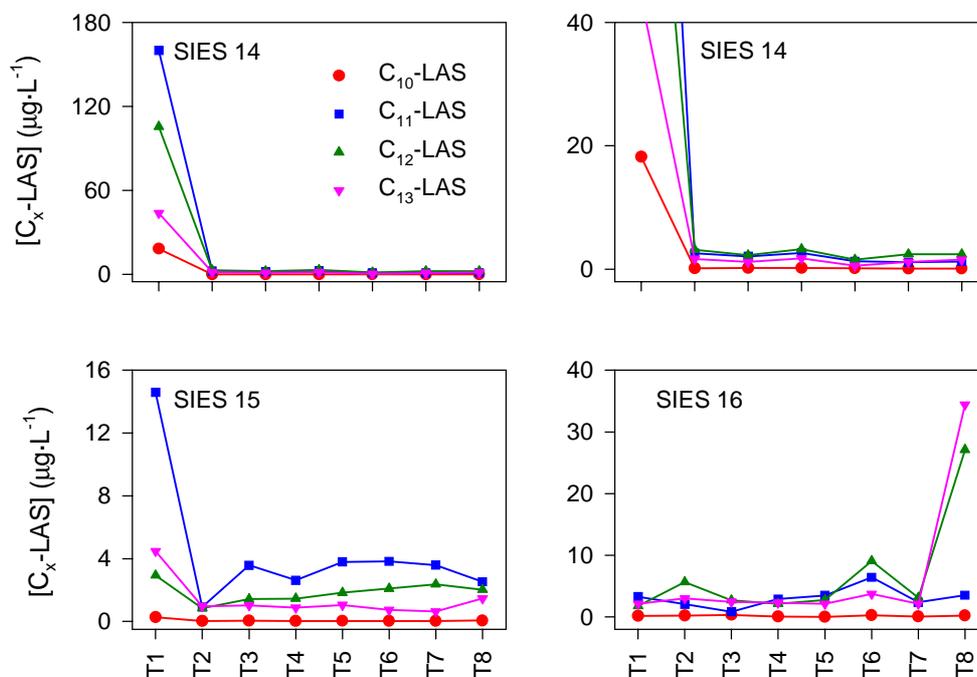


Figura 7.8. Variación de la concentración de los cuatro homólogos del LAS a lo largo del simulador en los experimentos SIES 14, 15 y 16. De SIES 14 se presenta una ampliación de la zona de menor concentración de tensioactivo.

El hecho de que en estos ensayos se trabaje a la misma salinidad en todos los tanques, implica que sólo se establece un gradiente de LAS. Conociendo el tiempo de residencia en cada tanque (4.62 h) y el valor de la corriente de deriva litoral (que en la bahía de Cádiz alcanza valores medios próximos a $40 \text{ cm}\cdot\text{s}^{-1}$), cada tanque podría asimilarse a una estación que se encuentra a una distancia determinada del punto de vertido de LAS (que está entrando en continuo al sistema a través del primer tanque). Así, podría establecerse en un cuerpo de agua de salinidad determinada cómo aumenta la biodegradación del LAS a medida que éste se aleja del punto de vertido. Haciendo los cálculos adecuados, el segundo tanque equivaldría a una estación situada a unos 6.65 Km de distancia del punto de vertido, el tercero, a 13.3 Km y así sucesivamente (Tabla 7.4.).

Tabla 7.4. Porcentaje de biodegradación de LAS total calculado para cada tanque en los ensayos SIES 14, 15 y 16.

	SIES 14	SIES 15	SIES 16	Distancia al punto de vertido
Tanque 1	83.34%	98.72%	93.60%	0 Km
Tanque 2	99.64%	99.81%	95.76%	6.65 Km
Tanque 3	99.72%	99.66%	95.81%	13.3. Km

Si bien en ensayos de degradación realizados por ciertos autores (Swisher, 1987; Terzic et al., 1992; Perales et al., 1999) con varios homólogos presentes de forma simultánea en el medio, se produce la degradación preferencial de los de cadena alquílica más larga, en los experimentos aquí descritos (SIES 14, 15 y 16) la longitud de la cadena alquílica de los distintos homólogos no parece haber afectado significativamente a la biodegradación.

De forma puntual, cabe reseñar el comportamiento anómalo que se ha registrado en el último tanque en el ensayo SIES 16 para los homólogos C₁₂-LAS y C₁₃-LAS, principalmente. En lugar de seguir la tendencia del resto de tanques, que es el descenso de la concentración de LAS, en este tanque se produce un incremento muy brusco de la concentración de los homólogos antes citados. Dicho incremento, además, ha sido detectado por medio de los dos métodos de análisis empleados, lo que hace pensar en un error metodológico en el pretratamiento de la muestra perteneciente a dicho tanque como la causa más razonable de tal comportamiento anómalo.

En cuanto a la proporción de homólogos, cabe destacar que, en los tres ensayos, y a lo largo de todos los tanques, los homólogos más abundantes fueron C₁₁-LAS y C₁₂-LAS (figura 7.9.). Este mismo comportamiento ha sido señalado por León et al. (2002) para muestras ambientales tomadas en cinco sistemas estuáricos de la Península Ibérica. Con respecto a si se respeta la proporción de homólogos que presenta la formulación comercial de LAS, en todos los casos, C₁₀-LAS es con diferencia el homólogo que más se aparta de dicha proporción original. Por el contrario, C₁₃-LAS es el homólogo cuya proporción se mantiene más cercana a la que presenta en la formulación comercial empleada.

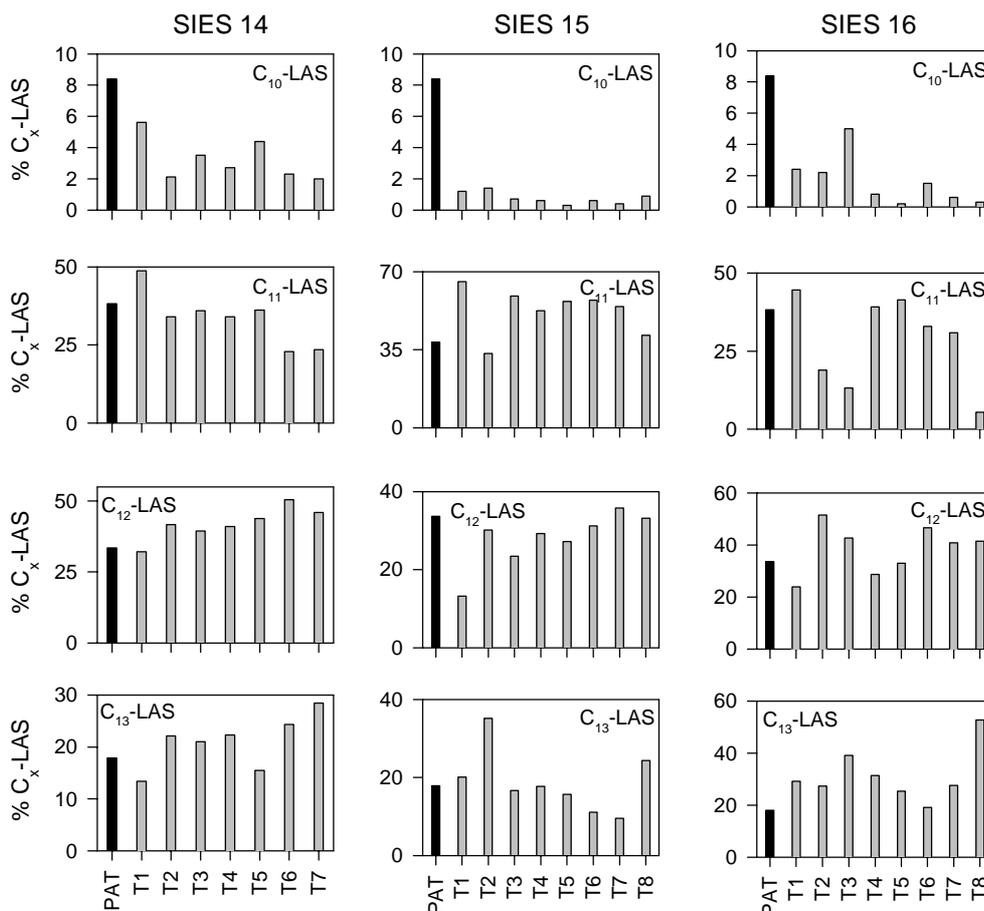


Figura 7.9. Variación del porcentaje de los cuatro homólogos de LAS en los tanques del simulador en SIES 14, 15 y 16. En cada gráfica, la barra oscura de la izquierda indica el porcentaje de cada homólogo en la formulación de LAS comercial empleado.

b) Comportamiento de los SPC

En los tres ensayos realizados para caracterizar la biodegradación de LAS a tres salinidades distintas se han detectado y cuantificado distintos intermedios de degradación (SPC) de LAS, lo que representa un hecho relevante ya que en la actualidad se dispone de un número muy limitado de trabajos de campo sobre la distribución de los SPC en agua de mar (González-Mazo et al. 1997a; Marcomini et al., 2000; León et al., 2002). También se ha realizado algún estudio sobre la caracterización de SPC en ensayos de laboratorio (e.g., Knepper y Kruse, 2000 y León, 2001).

Los homólogos encontrados van desde los 5 hasta los 13 átomos de carbono. La detección de estos intermedios se debe al aporte continuado de LAS al medio, ya que, son tan reactivos, que no han sido detectados en experimentos de biodegradación en discontinuo (León, 2001). Especialmente relevante ha sido la identificación de SPC de

cadena larga, detectándose incluso (en SIES 14 y 15) ácidos sulfofenilcarboxílicos de igual longitud de cadena que el homólogo de LAS de partida (C_{13} -LAS). Como el C_{13} -SPC sólo puede provenir del C_{13} -LAS, su detección corrobora la existencia de una ω -oxidación y, en consecuencia, la existencia de biodegradación primaria.

En la figura 7.10. se presentan las concentraciones de los distintos ácidos sulfofenilcarboxílicos cuantificados en el experimento SIES 14. Para todos los SPC, se detecta un descenso de la concentración de los mismos con el tiempo, lo que confirma que, al final del experimento, se completa la biodegradación primaria del LAS. A diferencia del sulfonato de alquilbenceno lineal, la biodegradación de los distintos homólogos de SPC no es tan rápida, apreciándose una disminución de tipo exponencial de los mismos desde el primer tanque (más próximo al vertido) hasta el último.

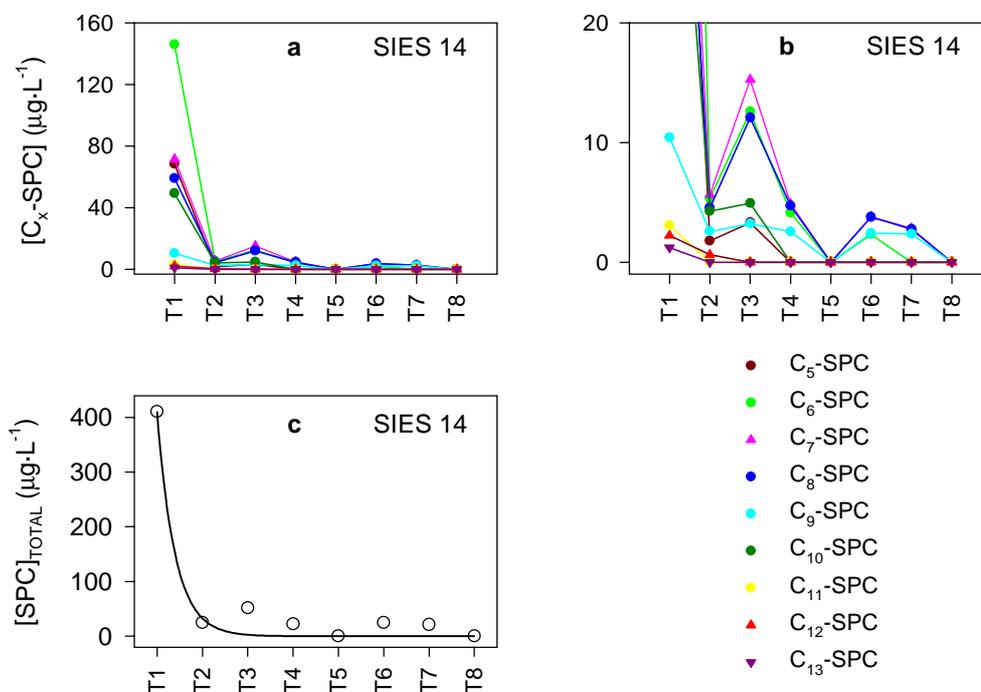


Figura 7.10. Variación de la concentración de los intermedios de degradación del LAS en SIES 14. a) Gráfica con el intervalo completo de concentraciones de los distintos homólogos. b) Ampliación de la zona de menor concentración. c) Concentración de SPC total.

También se observa que, los SPC de cadena más larga (C_{11} -SPC, C_{12} -SPC y C_{13} -SPC), que son los procedentes de las primeras etapas de biodegradación, son detectados únicamente en los dos primeros tanques (figura 7.10.) y experimentan un descenso muy brusco en su concentración. Haciendo una extrapolación entre los tanques y el tiempo

que representan, podría decirse que, los intermedios de longitud de cadena más larga desaparecen tras nueve horas aproximadamente. Por otra parte, los SPC de cadena intermedia (C_6 -SPC, C_7 -SPC y C_8 -SPC) son los más persistentes a lo largo de los tanques, decreciendo su concentración de forma más suavizada. Este comportamiento está de acuerdo con los descritos previamente por diversos autores (Knepper y Kruse, 2000; León et al., 2002). Si bien León et al. (2002) señalan que la cantidad combinada de C_6 -SPC, C_7 -SPC y C_8 -SPC constituyó más del 70% del total de SPC detectados en todos los sistemas naturales analizados, en los ensayos descritos en esta Memoria, dicho porcentaje osciló entre el 67% (en el caso de SIES 16) y el 55% (en SIES 14). Después del C_5 -SPC, la biodegradación es tan sumamente rápida que no se han detectado intermedios de longitud de cadena inferior, como también describe León (2001).

El experimento SIES 14 se desarrolló a una salinidad constante en todos sus tanques de 37; en SIES 15, el valor de salinidad disminuyó hasta 19 y, en SIES 16, hasta 3. En los tres experimentos, se obtiene un comportamiento similar para los intermedios de degradación.

A diferencia de SIES 14 y 15, en SIES 16 no se registra la existencia de C_{13} -SPC ni de C_{11} -SPC (figura 7.11.). Tampoco se ha detectado la presencia de C_5 -SPC (que sí aparecía en SIES 14). Por lo demás, el comportamiento del resto de homólogos es similar al que se ha presentado en SIES 14.

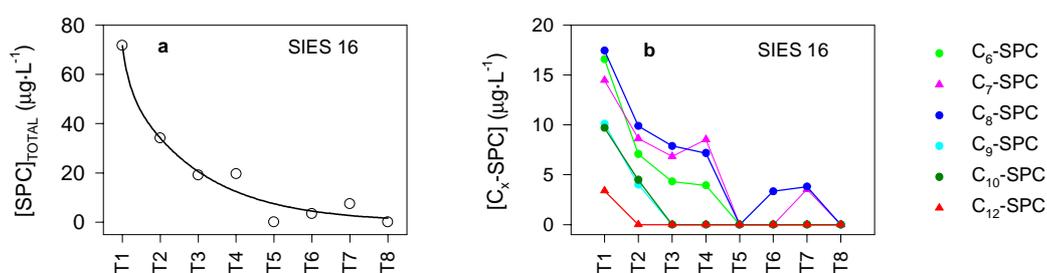


Figura 7.11. Variación de la concentración de los intermedios de degradación del LAS en SIES 16. a) Concentración de SPC total. b) Concentraciones de los distintos homólogos.

Las concentraciones de C_{12} -SPC, C_{10} -SPC y C_9 -SPC (los homólogos de cadena larga) descienden bruscamente a partir del primer tanque. De hecho, C_{12} -SPC desaparece en el primer tanque y C_9 -SPC y C_{10} -SPC lo hacen en el segundo. Por el contrario, a partir del tercer tanque, las concentraciones de los homólogos de cadena intermedia (C_6 -SPC, C_7 -SPC y C_8 -SPC) se mantienen con respecto al tanque anterior, lo que se debe a la ruptura

de los intermedios de cadena larga. Dichas concentraciones persisten dentro de un estrecho intervalo de valores durante un tramo del estuario, para ir disminuyendo posteriormente.

A la vista de los resultados anteriores, puede concluirse que, si bien en los tres ensayos se produce un decrecimiento en la concentración de SPC conforme los tanques se alejan del punto de vertido, el descenso en SIES 16 es más paulatino que en SIES 14, donde se produce un descenso muy brusco, sobre todo entre el primer y el segundo tanque, (figura 7.12.), mientras que SIES 15 presenta una tendencia intermedia a las anteriores. En cualquier caso, al final de los tres ensayos, las concentraciones descienden hasta unos valores no detectables, confirmando la degradación total del LAS a lo largo del simulador.

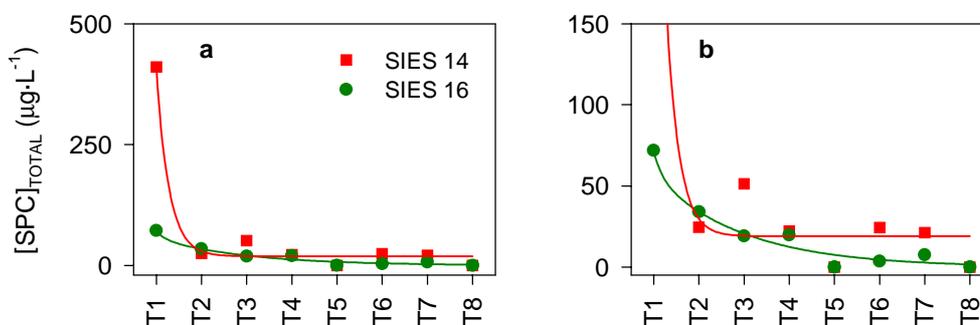


Figura 7.12. Evolución de las concentraciones totales de SPC en SIES 14 y 16. a) Gráfica completa. b) Ampliación de la zona de menor concentración de la gráfica anterior.

7.3.3. Ensayos de Biodegradación y Adsorción de LAS

a) Comportamiento del LAS

En la figura 7.13. se presenta la variación con la salinidad de la concentración de LAS adsorbido al material particulado y de la concentración de LAS disuelto para los cuatro homólogos del mismo en el ensayo SIES 17. En dicha figura se observa cómo existe una mayor concentración de LAS asociado al material particulado que de LAS en la fase disuelta. Este hecho es razonable, dada la adsorción preferencial que presenta el LAS sobre el material particulado, sobre todo la de los homólogos más hidrófobos que son los que poseen mayor longitud de cadena alquílica (Takada et al., 1992a; Terzic y Ahel, 1994; González-Mazo, et al., 1998). Así lo demuestran en el ensayo SIES 17 las concentraciones de C₁₂-LAS y C₁₃-LAS asociados a material particulado que son

superiores, en tres órdenes de magnitud, a las concentraciones de estos mismos homólogos en la fase disuelta.

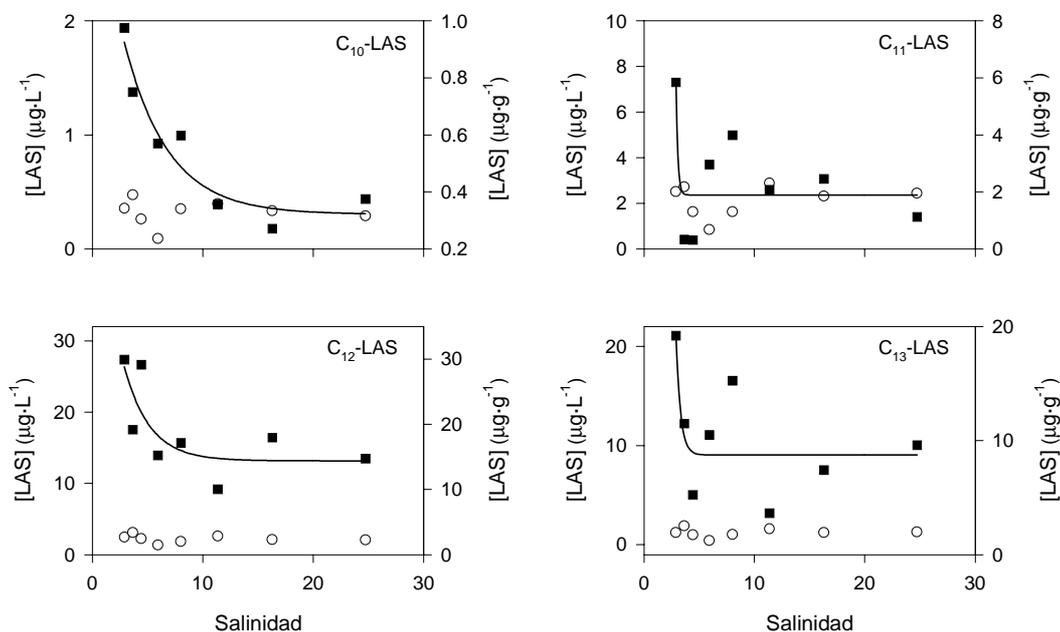


Figura 7.13. Variación con la salinidad de la concentración de LAS adsorbido al material particulado (■ eje de ordenadas de la derecha) y LAS en la fase disuelta (○ eje de ordenadas de la izquierda) para los cuatro homólogos de LAS en el ensayo SIES 17.

Aunque los otros dos homólogos (C_{10} -LAS y C_{11} -LAS) también presentan mayores concentraciones asociadas al material particulado, éstas presentan valores inferiores a las de C_{12} -LAS y C_{13} -LAS. Ello se debe a que C_{10} -LAS y C_{11} -LAS son menos hidrófobos que C_{12} -LAS y C_{13} -LAS. Como se observa en la figura 7.14., en todos los casos, los mayores valores del coeficiente de partición se obtuvieron para los homólogos más hidrófobos. A diferencia de otros trabajos, en los que el coeficiente de partición aumenta con la fuerza iónica (González-Mazo et al. 1998), en SIES 17 se aprecia un descenso de éste con dicha variable. Este hecho podría explicarse teniendo en cuenta que en SIES 17, además de adsorción, existe un proceso de biodegradación, que va provocando un descenso de los homólogos más hidrófobos, por lo que se encontrarían menos disponibles para adsorberse sobre el material particulado a medida que aumenta la salinidad.

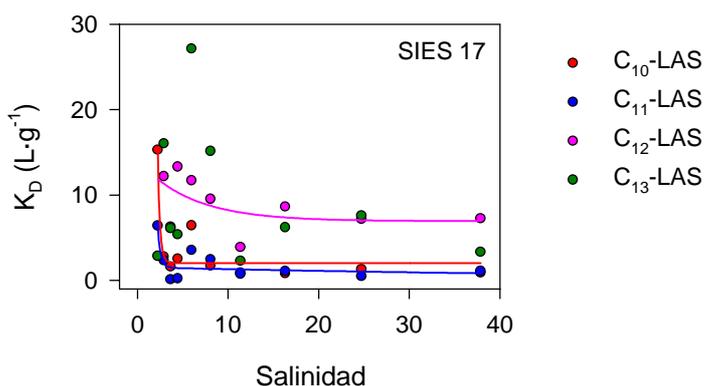


Figura 7.14. Evolución con la salinidad de los coeficientes de partición calculados para los cuatro homólogos del LAS en el experimento SIES 17.

En la figura 7.15. se presenta la variación con la salinidad de las proporciones (en %) de los homólogos de LAS asociados a material particulado en SIES 17. En dicha figura se observa cómo la proporción de los homólogos de cadena larga (C_{12} -LAS y C_{13} -LAS) se encuentra, en todos los tanques, por encima de la proporción que presentan en la formulación del LAS comercial empleado. Por el contrario, los homólogos de cadena corta (C_{10} -LAS y C_{11} -LAS) se encuentran, a lo largo de todo el gradiente de salinidad, por debajo de la proporción comercial.

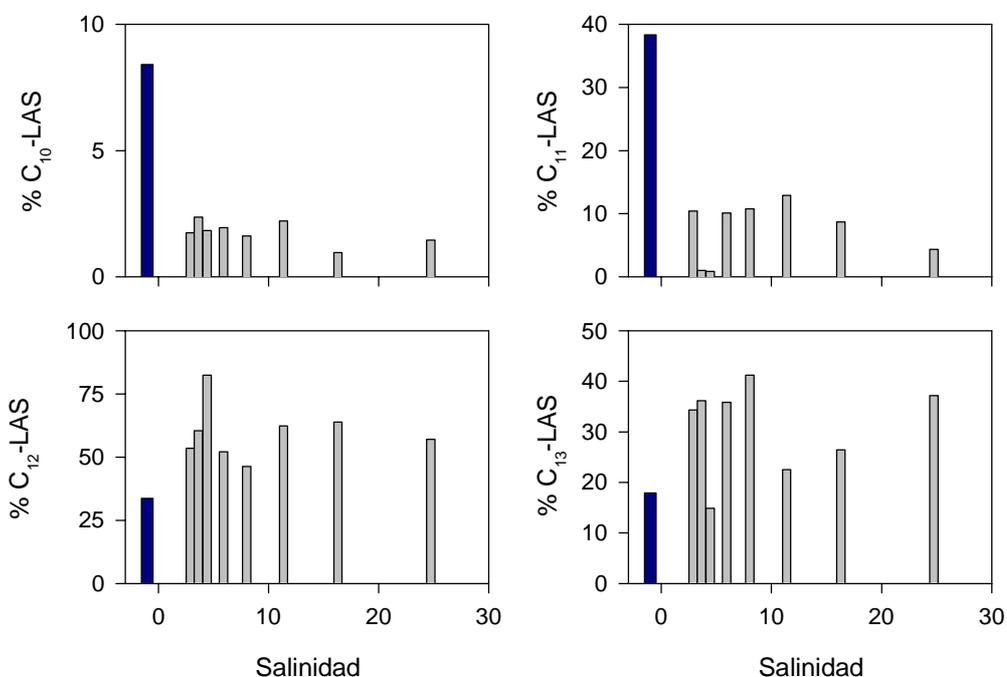


Figura 7.15. Variación con la salinidad del porcentaje de homólogos de LAS adsorbidos a material particulado en SIES 17. En cada gráfica, la barra oscura de la izquierda indica el porcentaje de cada homólogo en la formulación de LAS comercial empleado.

En cuanto a las concentraciones de los cuatro homólogos en la fase disuelta, es de destacar que los valores cuantificados fueron muy bajos (entre 0.09 y 2.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). De hecho, tales cantidades son tan pequeñas, que es imposible dilucidar una tendencia clara con respecto a la evolución de las proporciones de los cuatro homólogos con la salinidad (figura 7.16.).

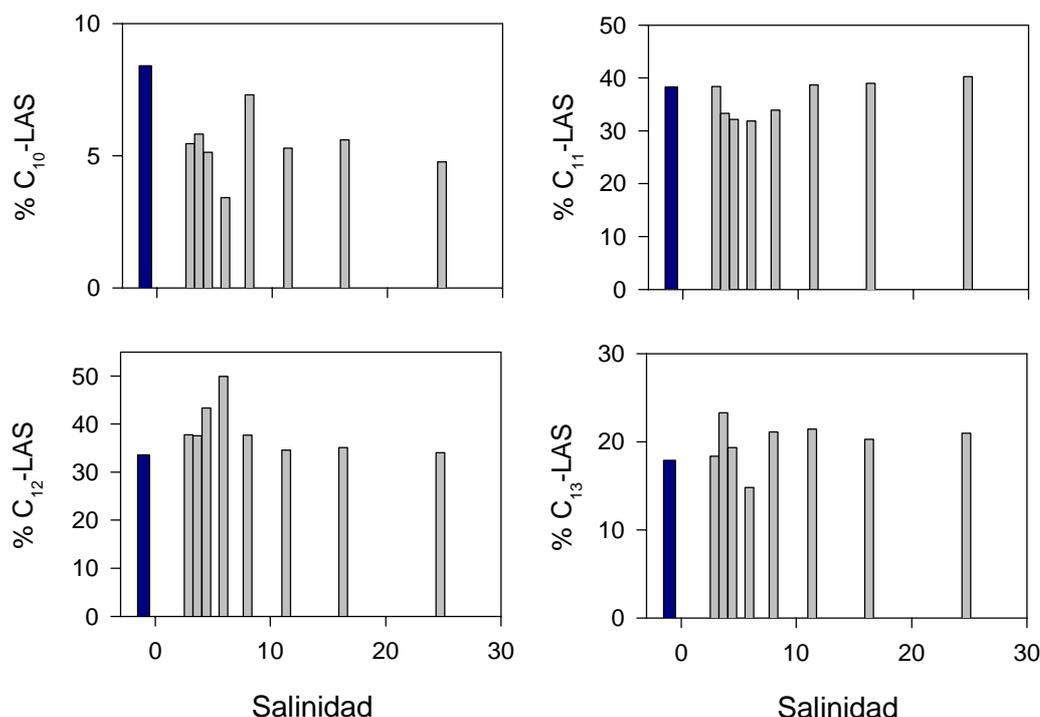


Figura 7.16. Variación con la salinidad del porcentaje de homólogos de LAS disuelto en SIES 17. En cada gráfica, la barra oscura de la izquierda indica el porcentaje de cada homólogo en la formulación de LAS comercial empleado.

b) Comportamiento de los SPC

Los SPC no poseen carácter surfactante, siendo compuestos más polares que el LAS, por lo que muestran menor afinidad que éste por el material particulado (León et al., 2002). De hecho, en este experimento no se ha detectado ningún homólogo de SPC en los sólidos en suspensión (o se encontraban a concentraciones tan sumamente bajas que eran inferiores al límite de detección del equipo).

En cuanto a los intermedios de degradación encontrados en las muestras de fase disuelta, hay que destacar que se han detectado todos los homólogos desde el C₆-SPC

hasta el C₁₃-SPC (figura 7.17.). El comportamiento que presentan es muy similar al que se describe para los ensayos SIES 14, 15 y 16. Los homólogos de cadena larga poseen unas mayores concentraciones en los primeros tanques que los de cadena intermedia, si bien su concentración desciende bruscamente mientras que la de los homólogos de longitud de cadena intermedia lo hace más suavemente.

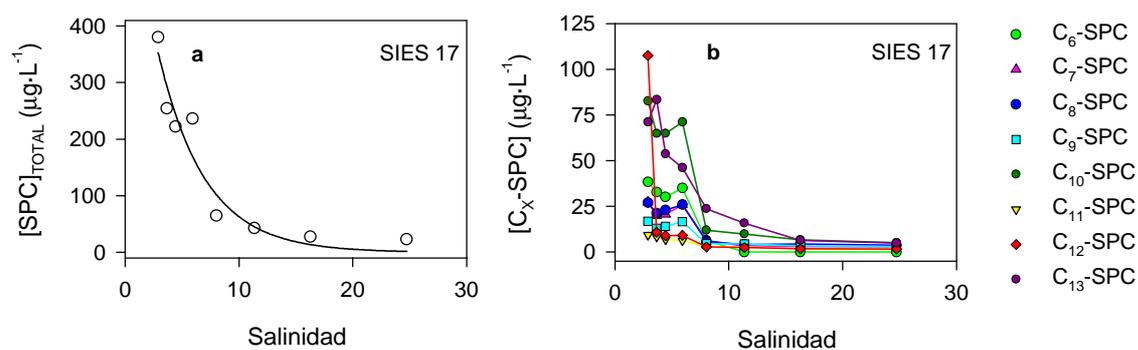


Figura 7.17. Variación de la concentración de los intermedios de degradación del LAS en SIES 17. a) Concentración de SPC total. b) Concentraciones de los distintos homólogos.

Como se ha constatado tras analizar los resultados en todos los experimentos conducentes a caracterizar el comportamiento del LAS y de los SPC en estuarios, sería conveniente disminuir el tiempo de residencia de los tanques en los futuros experimentos que deseen realizarse. De esta forma, se podría caracterizar mejor la biodegradación de un compuesto tan sumamente reactivo como es el sulfonato de alquibenceno lineal.

7.4. BIBLIOGRAFÍA

Amano, K., Fukushima, T., Inaba, K., Nakasugi, O. 1989. Adsorption of LAS with the suspended solids in natural aquatic systems. *Jap. J. Wat. Poll. Res.*, 12, 8: 38-47.

Amano, K., Fukushima, T., Nakasugi, O. 1991. Fate of linear alkylbenzenesulfonates in a lake estuary. *Wat. Sci. Technol.*, 23: 497-506.

Amano, K., Fukushima, T., Nakasugi, O. 1992. Diffusive exchange of linear alkylbenzenesulfonates (LAS) between overlying water and bottom sediment. *Hydrobiologia*, 235/236: 491-499.

Berna, J.L., Cavalli, L. 1999. LAS: Linear Alkylbenzene Sulfonate. Facts & Figures. European Council on Studies on LAB-LAS, a CEFIC sector group.

Cavalli, L., Gellera, A., Landone, A. 1993. LAS removal and biodegradation in a wastewater treatment plant. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 1777-1788.

Cavalli, L., Cassani, G., Lazzarin, M., Maraschin, C., Nucci, G., Berna, J.L., Braco, J., Ferrer, J., Moreno, A. 1996. Iso-branching of LAS of biodegradation study of two models compounds. *Toxicol. Environ. Chem.*, 54: 167-186.

Cohen, L., Moreno, A., Berna, J.L. 1993. Influence of calcium concentration in the washing liquor on detergent performance of linear alkylbenzene sulfonate. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 1: 79-82.

Cohen, L., Moreno, A., Berna, J.L. 1998. LAS magnesium salts –a contribution to mildness and performance. *Tenside Surfact. Det.*, 35, 4: 265-269.

Federle, T.W., Schwab, B.S. 1992. Mineralization of surfactants in anaerobic sediments of a laundromat wastewater pond. *Wat. Res.*, 26, 1: 123-127.

Folke, J., Landner, L. 2000. Risk assessment of LAS in sewage sludge and soil. Based on current literature. AF-MiljöforskarGruppen. Report to Kemist-Tekniska Leverantörförbundet (KTF), Stockholm.

Giger, W., Alder, A.C., Brunner, P.H., Marcomini, A., Siegrist, H. 1989. Behaviour of LAS in sewage and sludge treatment and in sludge-treated soil. *Tenside Surfact. Det.*, 26, 2: 95-100.

González-Mazo, E., Gómez-Parra, A. 1996. Monitoring anionic surfactants (LAS) and their intermediate degradations products in the marine environment. *Trends Anal. Chem.*, 15, 8: 375-380.

González-Mazo, E., Honing, M., Barceló, D., Gómez-Parra, A. 1997a. Monitoring long-chain intermediate products from the degradation of linear alkylbenzene sulfonates in the marine environment by solid-phase extraction followed by liquid chromatography/ion spray mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 2: 504-510.

González-Mazo, E., Quiroga, J.M, Sales, D., Gómez-Parra, A. 1997b. Levels of linearalkylbenzenesulfonate (LAS) in waters and sediments of the coastal ecosystems of the Gulf of Cádiz. *Toxicol. Environ. Chem.*, 59: 77-87.

González-Mazo, E., Forja, J.M., Gómez-Parra, A. 1998. Fate and distribution of linear alkylbenzene sulfonates in the littoral environment. *Environ. Sci. Technol.*, 31, 11: 1636-1641.

González-Mazo, E., Quiroga, J.M, Gómez-Parra, A. 1999. Linear alkylbenzenes sulfonates (LAS) as tracers of urban waste waters in shallow littoral ecosystems: a case study in the Bay of Cádiz. *Ciencias Marinas*, 25(3): 367-379.

Haigh, S.D. 1996. A review of the interaction of surfactants with organic contamination in soils. *Sci. Tot. Environ.*, 185: 161-170.

Holmstrup, M., Krogh, P.H. 1999. Effects of LAS on soil fauna. National Environment Research Institute (NERI), Dept. Of Terrestrial Ecology. LAS Risk Assessment for Sludge-Amended Soils, 19-20 April 1999, SPT Workshop in coordination with the DEPA, Copenhagen, Denmark.

Holt, M.S., Fox, K.K., Burford, M., Daniel, M, Buckland, H. 1998. UK monitoring study on the removal of linear alkylbenzene sulphonate in trickling filter type sewage treatment plants. Contribution to GREAT-ER project#2. *Sci. Tot. Environ.*, 210/211: 255-269.

Hrsak, D., Johanides, V., Starcevic, E. 1976. Changed in mixed bacterial population during linear alkylbenzenesulphonate (LAS) biodegradation. 7th International Congress on Surface Active Substances. Paper No. 256, D1, Moscú, 12-18 September 1976.

Huddleston, R.L., Allred, R.C. 1963. Microbial oxidation of sulfonates alkylbenzenes. *Dev. Ind. Microbiol.*, 4: 24-38.

Jiménez, L., Breen, A., Thomas, N., Federle, T.W., Sayler, G.S. 1991. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75: 1566-1569.

Knepper, T.P., Kruse, M. 2000. Investigations into the formation of sulfophenylcarboxylates (SPC) from linear alkylbenzenesulfonates (LAS) by liquid chromatography/mass spectrometry. *Tenside Surf. Det.*, 37: 41-47.

Kilikidis, S., Kamarianos, A., Karamanlis, X., Giannakou, U. 1992. Concentrations of LAS in the municipal waste water of the city of Thessaloniki and the seawater of the receiver gulf of Themaikos (N. Greece). *Fresenius Envir. Bull.*, 3: 95-100.

Konopka, A., Zakharova, T., Oliver, L., Camp, D., Turco, R.F. 1996. Biodegradation of organic wastes containing surfactants in a biomass recycle reactor. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62, 9: 3292-3297.

Larson, R.J. 1990. Structure-activity relationships for biodegradations of LAS. *Environ. Sci. Technol.*, 24, 8: 1241-1246.

Larson, R.J., Rothgeb, T.M., Shimp, R.J., Ward, T.E., Ventullo, R.M. 1993. Kinetics and practical significance of biodegradation of LAS in the environment. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 70, 7: 645-657.

León, V.M. 2001. Reactividad y mecanismos de transporte de alquilbenceno lineal sulfonatos (LAS) y sus intermedios de degradación en sistemas marinos litorales. Tesis Doctoral. Universidad de Cádiz, 225 pp.

León, V.M., Sáez, M., González-Mazo, E., Gómez-Parra, A. 2002. Occurrence and distribution of linear alkylbenzene sulfonates and sulfophenylcarboxylic acids in several Iberian littoral ecosystems. *Sci. Tot. Environ.*, 288: 215-226.

- Marcomini, A., Pjana, G., Sfriso, A., Quiroga, J.M. 2000. Behaviour of anionic and ionic surfactants and their persistent metabolites in the Venice Lagoon, Italy. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 2000-2007.
- Matthijs, E., De Henau, H. 1985. Adsorption and desorption of LAS. *Tenside Surfact. Det.*, 22, 6: 299-342.
- Matthijs, E., Stalmans, M. 1993. Monitoring of LAS in the North Sea. *Tenside Surfact. Det.*, 30, 1: 29-33.
- Millero, F.J. 1992. En *Chemical Oceanography* (F. J. Millero y M. L. Sohn, eds.). CRC Press, Boca Raton (USA). pp: 59-114.
- Moreno, A., Ferrer, J., Berna, J.L. 1990. Biodegradability of LAS in a sewer system. *Tenside Surfact. Det.*, 27, 5: 312-315.
- Moreno, A., Ferrer, J., Bravo, J., Berna, J.L., Cavalli, L. 1998. Effect of the alkyl Caín and concentration of linear alkylbenzene sulfonate on biodegradation kinetics. *Tenside Surfact. Det.*, 35, 5: 375-378.
- Painter, H.A., Zabel, T. 1989. The behaviour of LAS in sewage treatment. *Tenside Surfact. Det.*, 26, 2: 108-115.
- Perales, J.A., Manzano, M., Sales, D., Quiroga, J.M. 1999. Biodegradation of LAS in river water. *Int. Biodeter. Biodegr.*, 13: 155-160.
- Prats, D., Ruiz, F., Vázquez, B., Zarzo, D., Berna, J.L. Moreno, A. 1993. LAS homolog distribution shift during wastewater treatment and composting: ecological implications. *Environ. Toxicol. Chem.*, 12: 1599-1608.
- Quiroga, J.M., Sales, D., Gómez-Parra, A. 1989. Experimental evaluation of pollution potential of anionic surfactants in the marine environments. *Wat. Res.*, 23, 7: 801-807.
- Reiser, R., Toljander, H., Albrecht, A., Giger, W. 1997. Alkylbenzenesulfonates in recent lake sediments as molecular markers for the environmental behaviour of detergent derived chemicals. ACS SYMPOSIUM SERIES 671, Molecular Markers in Environmental Geochemistry, R.P. Eganhouse Editor, pp. 196-212.

Rubio, J.A., González-Mazo, E., Gómez-Parra, A. 1996. Sorption of LAS on marine sediment. *Mar. Chem.*, 54: 171-177.

Schröder, F.R. 1995. Concentrations of anionic surfactants in receiving riverine water. Results of a long-term monitoring programme in the river Rur. *Tenside Surfact. Det.*, 32, 6:492-497.

Smith, D.L. 1997. Impact of composition on the performance of sodium linear alkylbenzenesulphonate (NaLAS). *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 7: 837-845.

Stalmans, M., Matthijs, E., De Oude, N.T. 1991. Fate and effect of detergent chemicals in the marine and estuarine environment. *Wat. Sci. Technol.*, 24: 115.

Swisher, R.D. 1987. Marcel Dekker Publ., New York: 415-445.

Takada, H., Ishiwatari, R. 1991. LABs in urban riverine and coastal sediments and their usefulness as a molecular indicator of domestic wastes. *Wat. Sci. Technol.*, 25: 437-446.

Takada, H., Ogura, N., Ishiwatari, R. 1992a. Seasonal variations and models of riverine input of organic pollutants to the coastal zone: 1. Flux of detergent-derived pollutants to Tokyo Bay. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 12: 2517-2523.

Takada, H., Ogura, N., Ishiwatari, R. 1992b. Distribution of linear alkylbenzenes (LABs) and linear alkylbenzenesulfonates (LAS) in Tokyo Bay sediments. *Estuar. Coastal Shelf Sci.*, 35: 141-156.

Takada, H., Ogura, N. 1992. Removal of linear alkylbenzenesulfonates (LAS) in the Tamagawa Estuary. *Mar. Chem.*, 37: 257-273.

Terzic, S., Hrsak, D., Ahel, M. 1992. Enrichment and isolation of LAS degrading bacteria from estuarine and coastal waters. *Marine Poll. Bull.*, 24, 4: 199-204.

Terzic, S., Ahel, M. 1994. Input and behaviour of linear alkylbenzenesulphonates (LAS) in a stratified estuary. *Mar. Poll. Bull.*, 28, 12: 735-740.

Verge, C., Moreno, A., Bravo, J., Berna, J.L. 2001. Influence of water hardness on the bioavailability and toxicity of linear alkylbenzene (LAS). *Chemosphere* (en prensa).

Vives-Rego, J., López-Amorós, R., Guindulain, T., García, M.T., Comas, J., Sánchez-Leal, J. 2000. Microbial aspects of linear alkylbenzene sulfonate degradation in coastal water. *J. Surfact. Det.*, 3: 303-308.

West, C.C., Harwell, J.H. 1992. Surfactants and subsurface remediation. *Environ. Sci. Technol.*, 26, 2: 2324-2330.

White, G.F., Russell, N.J. 1994. Biodegradation of anionic surfactants and related molecules. En: *Biochemistry of microbial degradation*. Ratledge, C. (Ed.) Kluwer, Dordrecht. Pp: 143-177.

8. CONCLUSIONES

1. Se ha diseñado y construido un equipo que permite reproducir, de manera dinámica y a escala de laboratorio, el proceso de mezcla de las aguas continentales y marinas en estuarios verticalmente homogéneos. El equipo puede reproducir cualquier gradiente longitudinal de salinidad en régimen estacionario y simular los efectos que provoca en el medio cualquier régimen e intensidad de marea a que esté sujeto.

Eligiendo adecuadamente las condiciones de operación, se puede reproducir cualquier tiempo de residencia existente en estuarios reales, así como mantener los valores que se deseen de las principales características fisicoquímicas del medio. Con ello, los procesos químicos estudiados soportan el cambio de escala que necesariamente implica la simulación.

2. El equipo construido permite simular situaciones ambientales hipotéticas, con lo que se pueden prever las consecuencias ambientales de sucesos que, aunque posibles, aún no han tenido lugar y también establecer el comportamiento y los efectos en el medio ambiente de sustancias antes de que accedan a él. En este sentido, puede considerarse que podría utilizarse como una herramienta muy útil en las evaluaciones de impacto ambiental en los sistemas estuáricos.

3. Se ha establecido un procedimiento experimental que permite caracterizar la evolución del sistema del carbono inorgánico y los flujos de CO₂ agua-atmósfera a lo largo del gradiente longitudinal de salinidad de distintos estuarios. Se ha constatado que, en los ensayos en régimen estacionario, los flujos de CO₂ agua-atmósfera decrecen de forma exponencial con el aumento de salinidad, si bien en todos los casos existe un flujo neto de CO₂ desde el agua hacia la atmósfera. En el experimento realizado simulando un régimen mareal, los flujos registrados también fueron positivos, si bien su valor describió una variación sinusoidal a lo largo del tiempo, coincidiendo los valores máximos de flujo de CO₂ en cada tanque con los valores mínimos de salinidad, y viceversa.

4. Se ha determinado la reactividad de nutrientes durante el proceso de mezcla estuárica en los tres primeros ensayos que se realizaron con el equipo descrito, en los que se simuló el estuario del Guadalquivir. Las concentraciones de silicato y nitrógeno en este estuario son elevadas (100 μM y 450 μM , respectivamente), presentando ambas especies un comportamiento conservativo. El fosfato presenta, en cambio, una elevada

reactividad, especialmente a salinidades bajas. La retirada de fósforo inorgánico de la fase disuelta parece estar motivada principalmente por la formación de apatitos.

5. Se ha realizado una simulación del vertido de agua tóxica procedente del accidente minero de Aznalcóllar sobre el estuario del Guadalquivir. Los resultados obtenidos permiten asegurar que el vertido directo del agua embalsada en Entremuros habría originado una fuerte contaminación por Zn y Cd en el estuario. Las concentraciones alcanzadas habrían superado, respectivamente, 1300 y 7 ppb, y se habría provocado una importante acumulación de estos metales en el material en suspensión y en los sedimentos, especialmente en la zona de menor salinidad.

6. En los distintos experimentos sujetos a un gradiente de salinidad en los que se caracterizó el comportamiento del LAS y de sus intermedios de degradación, éste muestra un comportamiento no conservativo, debido fundamentalmente a la retirada del medio por procesos de biodegradación y adsorción. El LAS, como consecuencia de su carácter hidrófobo, muestra una gran afinidad por el sedimento y su adsorción aumenta con la longitud de cadena alquílica. Durante la biodegradación del LAS se ha detectado la presencia, como intermedios de biodegradación, de ácidos sulfofenilcarboxílicos de longitud de cadena entre 5 y 13 átomos de carbono. La acumulación y persistencia de los ácidos sulfofenilcarboxílicos de longitud de cadena intermedia (C_6 - C_8) a lo largo de los ensayos, indica que su degradación constituye la etapa limitante del proceso de biodegradación del LAS. También se ha detectado en la zona final del simulador la desaparición de todos los SPC. Este hecho es indicativo de la degradación completa del LAS introducido al sistema.