

II. ANTECEDENTES.

II. ANTECEDENTES

1. METALES EN LOS ECOSISTEMAS ACUÁTICOS

1.1 INTRODUCCIÓN

Los ecosistemas acuáticos han recibido a lo largo de los tiempos gran cantidad de residuos procedentes de actividades humanas. En los últimos años, se ha puesto de manifiesto que estos ecosistemas no tienen un poder limitado de dilución de desechos y que por el contrario, se deterioran más fácilmente que los espacios continentales (Alzieu C. y Maggi P., 1974; Updegraff, Stanton y Spencer, 1977).

La razón de esta particular sensibilidad de los ecosistemas acuáticos a la influencia de la contaminación, se debe en gran medida a la estructura de su cadena alimentaria (Morrison, 1991). Comparada con los ecosistemas terrestres, posee una biomasa relativamente pequeña que, sin embargo, presenta una gran variedad de niveles tróficos, por lo que frecuentemente se producen procesos de acumulación de sustancias xenobióticas y tóxicas (Förstner U. y Wittmann, 1983)

En las últimas décadas, se ha venido realizando un gran esfuerzo con objeto de identificar y determinar los contaminantes existentes en los ecosistemas acuáticos. En principio, cualquier compuesto que se encuentre en el medio en concentración superior a los niveles naturales puede alterar el equilibrio del ecosistema, llegando incluso a destruir el biotipo, a limitar la explotación de los recursos biológicos y a poner en peligro la salud humana. (Alzieu C. y Maggi P., 1974)

El estudio del comportamiento de los metales en los ecosistemas acuáticos tiene hoy en día una gran relevancia debido a la elevada toxicidad de un buen número de ellos y a su comportamiento acumulativo (Purves, 1985). Estos elementos no son biodegradables y sufren un ciclo eco-biológico en el que las aguas naturales constituyen las principales vías de transporte (Nürnberg, 1985).

En los trabajos sobre contaminación por metales es común el uso de los términos “metal pesado” y “metal traza”. El primero se emplea con metales que tienen una densidad superior a 4,5 gramos por centímetro cúbico; siendo los más comunes, cromo, manganeso, hierro, cobre, cinc, arsénico, plomo, cadmio, y mercurio (Nieboer y Richardson, 1980). Los que presentan una densidad inferior se califican como metales ligeros, un error común es clasificar a todos los elementos metálicos como pesados, independientemente de su densidad.

Tabla 1: Concentraciones medias (mg/kg) en la corteza terrestre de una selección de metales.

METALES ABUNDANTES	CONCENTRACIÓN	METALES TRAZA	CONCENTRACIÓN
Aluminio	81.300	Cromo	100
Hierro	50.000	Cinc	70
Calcio	36.300	Cobre	55
Sodio	28.300	Plomo	12,5
Potasio	25.900	Arsénico	1,5
Magnesio	20.900	Cadmio	0,2
Titanio	4.400	Mercurio	0,08
Manganeso	1.000	Plata	0,07

El término “metal traza” pretende indicar la abundancia natural del mismo en la corteza terrestre, por lo común, aquellos que se encuentran en proporciones menores o iguales al 0,1 % en peso (1.000 mg/kg) se sitúan en esa categoría (Alloway, 1995). Se incluyen en este grupo tanto elementos que son nutrientes esenciales, como metales y metaloides tóxicos. Los metales trazas tradicionalmente se suelen clasificar en dos subgrupos: esenciales para el correcto funcionamiento de los procesos bioquímicos (manganeso, cinc, etc.), y sin función biológica de interés (cadmio, mercurio, plomo, etc.). Estos

últimos son, en general, los contaminantes más importantes del medio acuático (Viarengo, 1985)

Desde el punto de vista de la contaminación los metales traza son más preocupantes que los abundantes, debido a que los primeros provocan mayores efectos nocivos sobre los organismos vivos. Los animales y las plantas han desarrollado diversos sistemas de adaptación para tolerar determinadas concentraciones de metales abundantes en la naturaleza y, de hecho, algunos de ellos son vitales para los seres vivos como, por ejemplo, el calcio y el hierro para el hombre. El contacto limitado con los metales traza hizo innecesarios tales ajustes, hasta que las actividades humanas aumentaron la concentración de los mismos en el ambiente.

1.2. FUENTES Y DISPERSIÓN DE METALES

Como ya se ha indicado, la carga metálica existente en los ecosistemas acuáticos tiene una doble procedencia; por un lado el denominado aporte natural, y por el otro, el antrópico (producido por las actividades humanas).

Entre los aportes naturales cabe destacar el producido por la erosión, que es considerada como una fuente importante de elementos metálicos a los ecosistemas acuáticos; a título orientativo, señalar que este proceso descubre anualmente del orden de 375.000 toneladas de cobre y 370.000 de cinc (Stocker y Seagers, 1981).

Las principales fuentes de contaminación antropogénica de metales son las actividades industriales y mineras, el uso de materiales y compuestos metálicos, y la combustión del petróleo y otros combustibles fósiles.

Las industrias generan residuos con elevadas concentraciones de metales, cuyo destino final suele ser el medio acuático. A título orientativo, en la Tabla 2 se muestran los principales elementos que vierten los distintos tipos de actividades industriales al medio ambiente (Barnhart, 1978).

Tabla 2: Metales vertidos al medio acuático por diversas industrias

INDUSTRIA	METALES VERTIDOS														
	Cr	Cu	Pb	Fe	Cd	Hg	Mn	Ni	Zn	As	Al	Ag	Mo	V	Sn
Minería metálica	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★		★	★	
Minería del carbón	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★		★		
Plaguicidas	★	★	★	★	★	★	★	★	★	★					★
Química inorgánica	★	★	★	★		★	★	★	★	★		★			
Hierro y Acero	★	★	★	★	★	★	★	★	★		★				★
Extracción Petróleo	★	★	★		★	★		★	★	★		★			
Vidrio	★	★		★					★						★
Centrales Térmicas	★	★		★		★			★		★			★	
Resinas y Polímeros	★	★	★	★	★			★	★						
Química Orgánica	★	★	★	★	★			★	★						
Fertilizantes	★	★	★	★	★	★	★	★	★		★				
Textiles	★														
Fabri. Pasta de papel	★	★	★			★	★								

Durante su utilización los materiales metálicos están sujetos a corrosión y desgaste, fenómenos que conducen al aporte directo de los mismos al medio ambiente. Los combustibles fósiles (carbón, petróleo y gas natural) al ser quemados para producir energía, emiten a la atmósfera cantidades importantes de metales en forma de partículas que, por deposición y por arrastre mediante el agua de lluvia, pueden llegar a las aguas naturales (Stocker y Seagers, 1981).

Otra fuente importante de metales es la actividad minera, que lleva realizándose durante miles de años. Sus mayores impactos sobre los

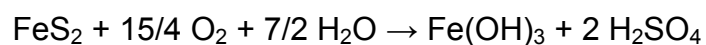
ecosistemas terrestre y acuático son fundamentalmente de carácter local, pero la dispersión de los metales puede alcanzar áreas muy extensas. En las minas se generan grandes cantidades de materiales de desechos y vertidos hídricos cargados de metales, que pueden provocar graves contaminaciones tanto del terreno como de los ecosistemas acuáticos (Roig et al., 1997). A nivel mundial se calcula que los aportes de plomo, al medio ambiente, procedentes de la minería son unas 2.330.000 toneladas anuales y los producidos por la erosión alcanzan las 180.000 toneladas anuales, lo que supone un factor de amplificación (toneladas procedentes de la minería/toneladas procedentes de la erosión) de 13. De igual forma elementos como cobre y cinc, presentan factores de amplificación de 12 y 11, respectivamente.(ver Tabla 3)

Tabla 3: Comparación de los aportes de metales (10^3 T/año) realizados por la erosión y por la minería (Stocker y Seager, 1981).

METAL	EROSIÓN	MINERÍA	FACTOR AMPLIFICACIÓN (Minería/Erosión)
Plomo	180	2330	13
Mercurio	3	7	2,3
Cobre	375	4660	12
Cinc	370	3930	11
Níquel	300	358	1,2
Plata	5	7	1,4
Manganeso	440	1600	3,6
Molibdeno	13	57	4,4
Estaño	2	166	83

Entre las sustancias procedentes de las minas con mayor potencial contaminador por metales destaca la pirita (FeS_2), ya que, además de azufre, contiene elementos metálicos como cobre, hierro, arsénico, cinc, plomo, cobalto, etc. Otro factor contaminante de la pirita es su capacidad de generar

ácido sulfúrico (H₂SO₄), en presencia de oxígeno, humedad y bacterias (como la *Thiobacillus ferrooxidans*), mediante la siguiente reacción:



La aparición de este ácido en las aguas de escorrentía favorece la solubilización de compuestos metálicos, desde los sedimentos y el suelo, a las aguas.

Una vez que los metales son emitidos (tanto desde fuentes naturales como antropogénicas) se dispersan en el medio ambiente, siendo las principales vías de dispersión el transporte acuático y el atmosférico (Salomons y Förstner, 1984).

La mayor parte de la carga metálica emitida al medio acuático es transportada por el agua de los ríos. En este sentido conviene señalar que las cuencas fluviales no son simples contenedores a través de los cuales son arrastrados al mar los metales sino que, al tratarse de un desplazamiento lento y complejo, se producen fenómenos fisicoquímicos (precipitación, adsorción, formación de complejos, etc.) que varían el contenido y la forma química en la que se presentan los metales (Catalán y Catalán, 1987).

Los metales introducidos en el ecosistema acuático, sufren una serie de reacciones químicas y procesos biológicos que determinan la asociación de una elevada proporción de ellos en los sedimentos. Así, una fracción importante de elementos metálicos se complejan a ligandos orgánicos e inorgánicos existentes en las solución, mientras que otra puede interaccionar con partículas en suspensión produciéndose a continuación su adsorción en la interfase sólido-agua, precipitación o captación por organismos planctónicos, que a su vez sedimentan (Tessier y Campbell, 1990).

1.3 CICLO BIOGEOQUÍMICO

El destino final de los metales en los ecosistemas acuáticos son los sedimentos. No obstante, en ocasiones, no quedan retenidos indefinidamente

en ellos, sino que se reciclan y vuelven al agua tras la acción de agentes físicos, químicos y biológicos.

Entre los modelos de ciclos biogeoquímicos de metales en ecosistemas acuáticos, uno de los más aceptados es el propuesto por Hart (1982), basado en la hipótesis de que los metales aportados a las aguas se encuentran distribuidos en compartimentos ambientales, entre los que pueden transferirse por distintos mecanismos.

Existen tres compartimentos principales: sedimentos, partículas en suspensión y fase disuelta, y dos secundarios: organismos bentónicos (animales o plantas que habitualmente viven en contacto con el fondo) y el formado por invertebrados y peces. Si bien la mayor parte de la carga metálica se encuentra en los tres compartimentos ambientales principales (anteriormente indicados) pueden transferirse a organismos bentónicos y a invertebrados y peces, pudiendo ocasionar efectos nocivos tras ser consumidos por los seres humanos.

La Figura 1 muestra las principales vías de transferencia de los metales entre los distintos compartimentos. Los elementos metálicos existentes en la fase disuelta son susceptibles de ser incorporados a las partículas en suspensión, y a los invertebrados y peces (vía 1), o liberados de ellos (vía 2) mediante diversos mecanismos fisicoquímicos, biológicos, etc. El material en suspensión, por su parte, puede depositarse en forma de sedimentos (vía 3) enriqueciéndolos en metales. También pueden ser transferidos de los sedimentos a otros compartimentos (vía 4). Los metales disueltos pueden ser incorporados directamente a los sedimentos (vía 5), de donde, en determinadas circunstancias, pueden volver a la fase disuelta (vía 6). Por último, los elementos metálicos que llegan al sistema, en cualquiera de sus formas, son capaces de entrar en el ciclo biológico (vía 7) o interactuar directamente con los sedimentos o con los organismos bentónicos (vía 8).

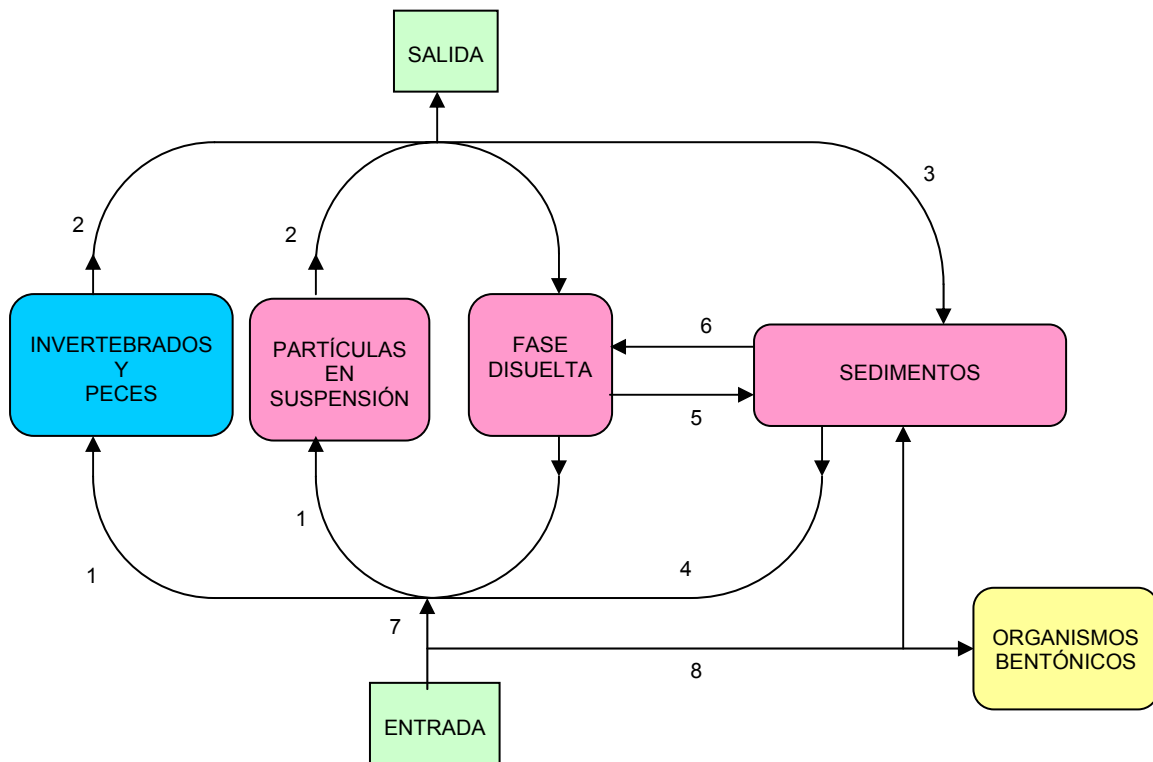


Figura 1: Modelo de ciclo biogeoquímico en los ecosistemas acuáticos.

El resultado final de lo anteriormente expuesto es que una parte de los metales que entran en el sistema quedan retenidos en los sedimentos, mediante diversos mecanismos, entre los que se pueden citar: deposición de partículas sólidas, adsorción sobre partículas, precipitación en forma de carbonatos, hidróxidos o sulfuros y asociación con compuestos orgánicos (Anderson y Rubin, 1981; Allan, 1986). En estos fenómenos juegan un papel importante la superficie de los sedimentos, el tamaño de las partículas y su cohesión, la presencia de materia orgánica y las condiciones del medio (pH, salinidad, potencial redox, etc.) (Tipping et al., 1981).

Los metales que se encuentran retenidos en los sedimentos constituyen un riesgo potencial para la calidad de las aguas y para los seres vivos, debido a

que pueden ser solubilizados y volver al agua.

Entre los factores que determinan la solubilidad de los elementos metálicos asociados a los sedimentos, destacan los siguientes:

- *Acidificación.* Se ha encontrado que existe una importante influencia del pH en los niveles de metales liberados desde los sedimentos (Dickson, 1980). Un cambio hacia condiciones más ácidas provoca la disolución de carbonatos e hidróxidos metálicos y, como consecuencia, la liberación de los metales asociados a estos compuestos, tales como cadmio, cobalto, mercurio y cinc (Förstner et al., 1990; Plant y Raiswell, 1983).
- *Procesos de oxidación/reducción.* Estos procesos, junto con las variaciones del pH, son los más significativos en los mecanismos de liberación de metales desde los sedimentos (Förstner, 1993). Es de esperar que cuando se produzca un cambio de condiciones reductoras a oxidantes, los sulfuros metálicos se transformen y aumenten la acidez, lo que determina la liberación de algunos elementos como mercurio, cinc, plomo, cobre y cadmio.
- *Incremento de la salinidad.* Produce un reemplazamiento o intercambio de iones metálicos absorbidos sobre las partículas.
- *Agentes complejantes.* Su presencia incrementa la solubilización de elementos metálicos desde los sedimentos acuáticos. El grado de movilización dependerá, en estas circunstancias, de la concentración del agente complejante, del pH, de la forma de interactuar con los metales en los sedimentos y de su competitividad con otros cationes (Salomons, 1983).
- *Actividad microbológica.* Los microorganismos intervienen en la movilización de tres formas diferentes: formando compuestos orgánicos capaces de complejar iones metálicos, modificando las propiedades físicas y las condiciones del pH del medio, y mediante procesos de oxidación-reducción catalizados por enzimas (Craig, 1986).

- *Acción de vientos, corrientes y mareas.* Estos agentes provocan la resuspensión de la materia sedimentada, lo que facilita la liberación de algunos metales. Este fenómeno es especialmente importante cuando los sedimentos son ricos en sulfuros y se encuentran en condiciones anaerobias (en ausencia de oxígeno); la resuspensión permite que las partículas alcancen zonas más ricas en oxígeno, produciéndose la oxidación de algunos constituyentes, con la consiguiente disolución de metales asociados a éstos.

Estos aspectos tienen una especial importancia en los estuarios (desembocadura de un río en el mar, donde se realiza la mezcla de aguas dulce y marina y que está sometido a la acción de las mareas) debido, entre otras razones, a que la interfase agua dulce-salada se caracteriza por sus drásticos cambios en diversos parámetros fisicoquímicos (salinidad, pH, etc.).

2. METALES EN ORGANISMOS VIVOS

2.1 INTRODUCCIÓN

En los ecosistemas acuáticos las vías básicas por las que pueden interactuar los metales con la biota (seres vivos) son: el agua, los sólidos en suspensión, los sedimentos y las sustancias que toman como alimentos.

La mayor o menor asimilación de metales por los organismos vivos depende de la concentración y de la disponibilidad biológica de dichos elementos. Los iones metálicos en solución y la mayor parte de los adsorbidos en partículas sólidas en suspensión son los más perjudiciales para los seres vivos, debido a la facilidad con que son asimilados. Los metales presentes en sólidos orgánicos y los precipitados o coprecipitados en forma de óxidos, se suelen asimilar con mayor dificultad. Cuando los metales forman parte de la red cristalina de minerales son muy difícilmente asimilables, lo que da lugar a una disminución de su toxicidad potencial.

Por otra parte los metales, a diferencia de muchos otros contaminantes, no se degradan ni biológica ni químicamente, lo que determina que sus efectos nocivos sobre el ecosistema perduren durante mucho tiempo.

Una vez que los microorganismos y la microflora incorporan elementos metálicos a sus estructuras celulares, pueden transmitirse a otras especies situadas en un nivel superior de la cadena trófica (o alimentaria) y, cuando el elemento es fácilmente retenido en los tejidos de los organismos, se produce el fenómeno de bioacumulación. Un ejemplo significativo de este fenómeno se presenta en los invertebrados acuáticos, en especial con los bivalvos, que tienen una gran capacidad para acumular metales en sus órganos (Potter et al., 1975). Admitiendo que la cantidad de alimentos que toma diariamente un organismo es, aproximadamente, diez veces la cantidad de tejido a regenerar, puede deducirse que la concentración de contaminante aumenta desde la presa al depredador. Esta capacidad de concentración recibe el nombre de “biomagnificación” (González-Regalado, 1994). De esta forma, los contenidos de metales en miembros de eslabones superiores de la cadena trófica, llegan a alcanzar valores mucho más elevados que los del medio en el que viven, con lo que su consumo puede llegar a constituir un serio peligro para la salud humana.

Tabla 4. Factores de enriquecimiento en moluscos bivalvos (concentración en el cuerpo/concentración en el agua).

ELEMENTO	OSTRA	MEJILLÓN	ALMEJA
Ag	18.700	330	2.300
Cd	318.000	100.000	2.260.000
Cr	60.000	320.000	200.000
Cu	13.700	3.000	3.000
Fe	68.200	196.000	291.500
Mn	4.000	13.500	55.500
Mo	30	60	90
Ni	4.000	14.000	12.000
Pb	3.300	4.000	5.300
V	1.500	2.500	4.500
Zn	110.300	9.100	28.000

En la Figura 2 se expone un esquema del proceso de biomagnificación a

través de la cadena alimentaria, en el que el metal se concentra al pasar de un eslabón a otro de la cadena.

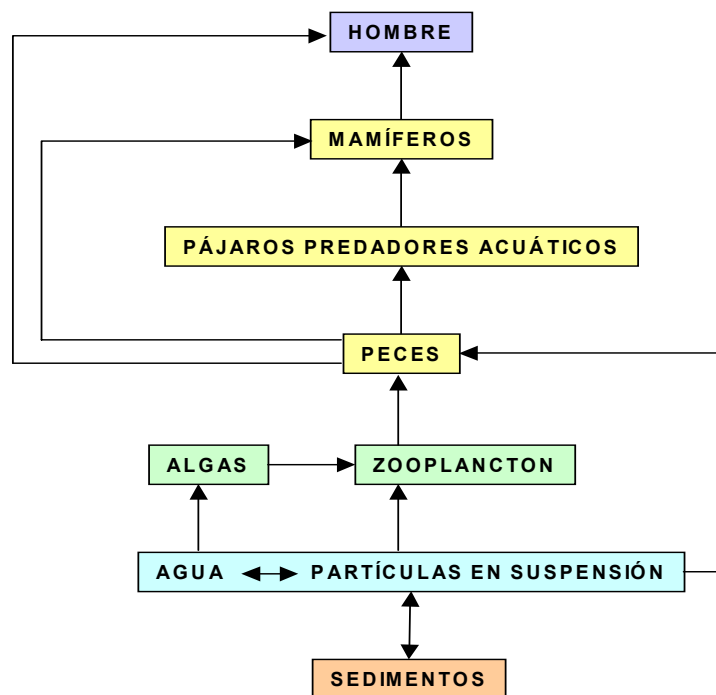
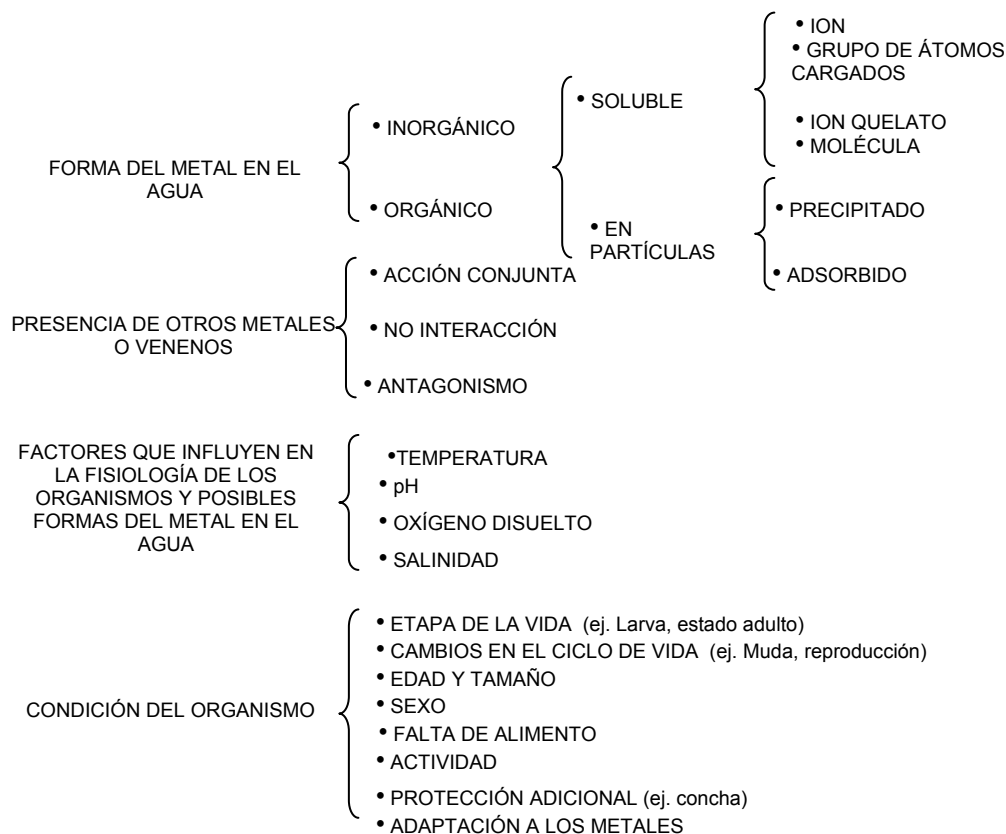


Figura 2: Biomagnificación de los metales en la cadena alimentaria.

La tendencia acumuladora de los metales en los seres vivos se puede valorar a través de sus vidas medias (tiempo medio que permanece en sus órganos o tejidos). En la mayoría de los casos estos valores son inversamente proporcionales a los niveles naturales con que estos elementos se presentan en el medio ambiente, de donde se deduce que los seres vivos han desarrollado mecanismos de defensa para regular la presencia de los metales en sus cuerpos y adaptarse al medio. Son de destacar las prolongadas vidas medias de numerosos metales en los seres humanos, tales como el plomo (1460 días), el cinc (933 días) y el níquel (667 días) (Stocker y Seagers, 1981).

2.2 TOXICIDAD DE LOS METALES

Cuando los niveles de metales en el medio ambiente exceden los límites tolerados por los seres vivos, comienzan a ser perceptibles sus efectos tóxicos que, a su vez, están influidos por una amplia gama de factores como se muestran en el siguiente esquema (Bryan, 1976).



Existe un buen número de metales (hierro, manganeso, cobre, cinc, etc.) que son esenciales para la vida, ya que forman parte de enzimas y proteínas e intervienen en diversos procesos bioquímicos necesarios para el normal desarrollo de los animales y plantas; sin embargo, pueden llegar a ser tóxicos e incluso letales para los seres vivos, a partir de ciertos niveles.

Este hecho se presenta en la Figura 3, en la que la región llana refleja las condiciones óptimas de crecimiento, salud y reproducción, e indica que tanto una deficiencia como un exceso tienen efectos adversos. Una región llana muy amplia corresponde a una baja toxicidad del metal, mientras que una región llana estrecha revela un pequeño rango entre concentraciones esencial y perjudicial.

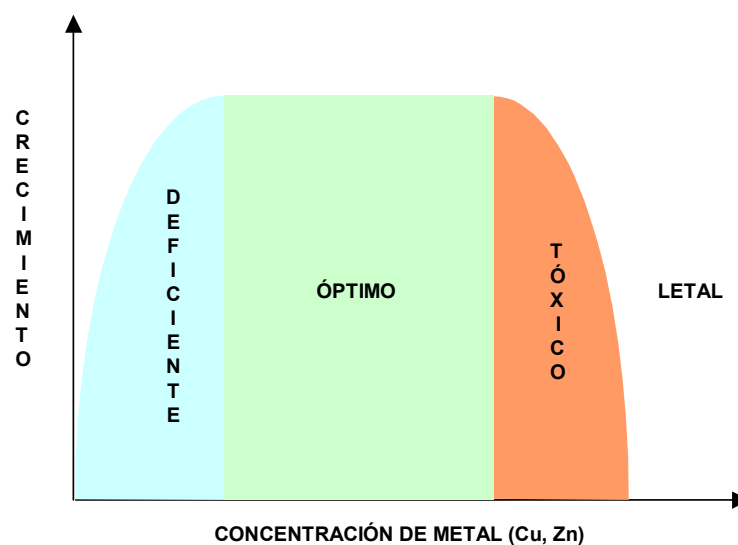


Figura 3: Respuesta de los organismos en función de la concentración de metales esenciales.

Algunos elementos metálicos (cadmio, mercurio, plomo, etc.) no son esenciales ni proporcionan efectos beneficiosos sobre los seres vivos, presentando una respuesta como la de la Figura 4.

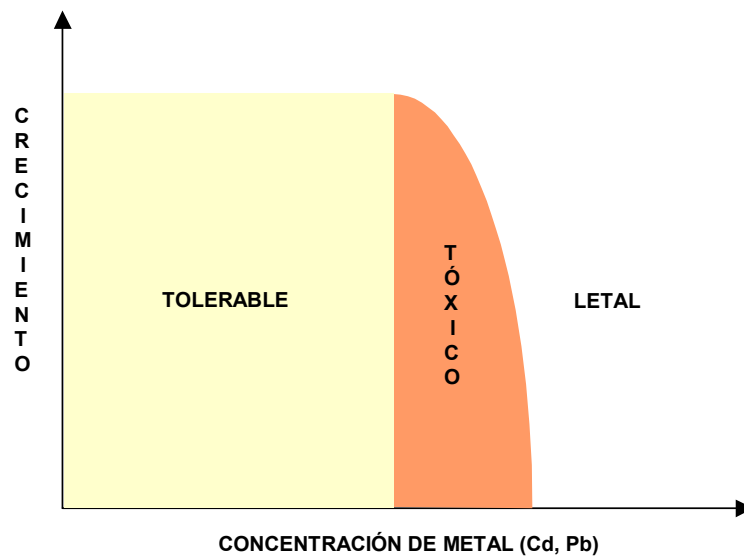


Figura 4: Respuesta de los organismos en función de la concentración de metales no esenciales.

Los iones metálicos esenciales para los organismos vivos son generalmente los más abundantes en la naturaleza y, además, están disponibles como especies solubles. Los metales con un número atómico mayor que 40, al ser escasos en la naturaleza, no suelen ser utilizados por los seres vivos. Entre los que tienen un número atómico menor, no todos ellos son esenciales, como por ejemplo el titanio dada su baja solubilidad. Los metales se pueden clasificar, según Wood (1974) en tres grupos:

- No críticos:

Na, K, Mg, Ca, Fe, Li, Rb, Sr, Al y Si.

- Tóxicos, pero muy insolubles o muy raros:

Ti, Hf, Zr, W, Nb, Ta, Re, Ga, La, Os, Rh, Ir, Ru y Ba.

- Tóxicos y relativamente accesibles:

Be, Co, Ni, Cu, Zn, Sn, As, Se, Te, Pd, Ag, Cd, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Sb y Bi.

A continuación se comentan las principales características tóxicas de los metales objeto de estudio en este trabajo.

El **cadmio** es un metal muy tóxico y peligroso para la salud humana. Los precedentes históricos de contaminación aguda por cadmio se hayan en Japón, en las cercanías de Fuchu, donde en 1946 apareció la enfermedad denominada Itai-Itai, cuyos efectos son la deformación del esqueleto, reducción del tamaño del cuerpo y la aparición de diarreas y grandes dolores (Hutchinson y Meema, 1987). La causa de esta enfermedad fue la ingestión de agua, arroz y peces contaminados por este elemento. Se ha observado que determinadas colectividades de la fauna acuática (moluscos y crustáceos) acumulan grandes cantidades de este metal, por lo que el consumo de estos animales puede ser una importante vía de penetración de cadmio en el organismo humano.

El **plomo** ha suscitado en las últimas décadas un especial interés y preocupación, debido al constante aumento de su concentración en el medio ambiente. Su forma química influye notablemente en su comportamiento biológico en el cuerpo humano. Los compuestos orgánicos de este metal, tales como el tetraetilo de plomo, son rápidamente absorbidos a través de la piel y mucosas, mientras que el plomo inorgánico se absorbe, fundamentalmente, a través de los tractos gastrointestinales y respiratorios. La anemia es el primer síntoma del envenenamiento crónico producido por el plomo, además puede producir dolores abdominales, náuseas, vómitos, etc.

El **cinc** presenta pocos efectos nocivos en los seres humanos, sin embargo es tóxico para los peces, ya que, según se ha comprobado, forma compuestos insolubles con la mucosa que cubre sus branquias, dañando al epitelio branquial o actuando como veneno de acción interna.

El **hierro** es un metal imprescindible para el correcto desarrollo de los animales y vegetales, puesto que forma parte de diversas enzimas (Gutteridge

y Halliwell, 1989). Solo presenta efectos tóxicos sobre los seres vivos cuando las cantidades asimiladas son muy elevadas, salvo en el caso de los peces, a los que ocasiona daños al precipitar en sus branquias como hidróxido de hierro (Förstner y Wittmann, 1983).

La mayor parte de los compuestos del **arsénico** son susceptibles de provocar una intoxicación aguda, algunos de ellos se han utilizado en la guerra química o como pesticidas. Es un elemento acumulativo y de efectos crónicos a largo plazo en los seres vivos; en organismos superiores da lugar a la enfermedad denominada “*de pie negro*”, que provoca trastornos en el sistema vascular periférico, acompañados de gangrena, hiperqueratinosis, hiperpigmentación y cáncer de piel.

El **mercurio** es uno de los elementos más tóxicos y se caracteriza porque su concentración aumenta notablemente a lo largo de la cadena trófica. Los compuestos orgánicos del mercurio, y en especial los de bajo peso molecular como los alquimercuriales, están considerados como los más peligrosos para los seres humanos, dado que se acumulan en todos los tejidos produciendo graves daños.

El **manganeso** es esencial para la vida, por formar parte de algunas enzimas como la arginasa y la piruvato carboxilasa. Cuando está presente como manganeso (VII) posee un elevado poder oxidante, por lo que pequeñas concentraciones de esta especie son letales. No obstante, no es frecuente encontrar manganeso en la naturaleza en dicho estado de oxidación, debido a que se reduce con facilidad a manganeso (II), con tendencia a formar especies poco solubles y, por consiguiente, escasamente asimilables y de baja toxicidad.

El **cobre**, que forma parte de enzimas y proteínas, es un elemento esencial en la nutrición. Sin embargo, en concentraciones elevadas es tóxico para la mayoría de los seres vivos, en el caso de los seres humanos puede causar gastroenteritis, náuseas y trastornos hepáticos.

El **níquel** presenta una considerable toxicidad en peces y plantas acuáticas. Para la vida humana es esencial en pequeñas concentraciones, pero puede presentar toxicidad aguda por interacción con otros elementos como

calcio, hierro o cinc. Además, en estudios de epidemiología se ha demostrado que los compuestos del níquel pueden producir cáncer en nariz, laringe y pulmón (Jiménez Gómez, 1992).

El **cromo**, que es esencial para la vida en pequeñas cantidades, produce efectos perjudiciales en los animales por encima de ciertos niveles. Un exceso de este elemento origina trastornos digestivos graves y puede llegar a ser cancerígeno por acumulación; su toxicidad depende del estado de oxidación con que se presente: así mientras el cromo (III) es ligeramente tóxico, el cromo (VI) es muy tóxico por tener un elevado poder oxidante.

2.3 ENSAYOS DE TOXICIDAD

La evaluación de la toxicidad presenta notables dificultades, si se tiene en cuenta que los metales y los compuestos químicos en general no se encuentran en el medio ambiente como entidades independientes, sino en forma de mezclas. Los efectos tóxicos de muchos compuestos frente a un organismo vivo determinado pueden ser: aditivos, sinérgicos y antagónicos (Sprague, 1970). El término aditivo se utiliza cuando el resultado de la combinación de sustancias equivale a la adición de los efectos individuales de cada compuesto. En el caso de que el efecto de la combinación sea mayor que la simple adición, se dice que se produce sinergismo. Por último, cuando el daño causado por una especie se ve neutralizado, o reducido, por otra presente en la mezcla se dice que se origina un antagonismo.

En la literatura científica se pueden encontrar ejemplos de métodos para calcular el efecto tóxico de grupos de contaminantes a partir de los individuales (Sprague, 1970); sin embargo, la utilización de estos métodos es muy arriesgada, debido a la posibilidad de combinaciones entre diferentes mecanismos bioquímicos de toxicidad de los distintos tipos de sustancias (Ribó, 1992).

Ante la dificultad de predecir los efectos tóxicos a partir de la composición química, se ha generalizado el uso de los llamados bioensayos de

toxicidad. En estos ensayos se exponen organismos vivos a la muestra objeto de estudio, o a un lixiviado de ésta, y se evalúa la toxicidad a partir de la respuesta biológica obtenida (Ribó, 1992). La forma más común de expresar la toxicidad es a través de la concentración letal cincuenta, CL₅₀, o concentración de contaminante en solución capaz de causar la muerte al 50% de la población sometida a ensayo durante un tiempo dado.

El problema se plantea a la hora de elegir el ser vivo que pueda ser más adecuado para realizar estos ensayos; las propiedades fundamentales que debe cumplir son: facilidad de manipulación, reproducibilidad y posibilidad de cuantificación (Álvarez et al., 1996). De todos los organismos propuestos (*Daphnia magna*, rotíferos, algas, bacterias, anélidos, peces, etc.), probablemente los ensayos con bacterias son los que mejor se ajustan a las propiedades anteriormente citadas.

Los problemas más importantes asociados con la determinación de la toxicidad, mediante bioensayos que utilizan peces o mamíferos como organismos de prueba, son su larga duración y su complejidad experimental, que hacen muy difícil determinar los efectos nocivos de un número elevado de compuestos, en tiempo y coste razonables (Ribó, 1992) así, por ejemplo, para cada uno de los test de toxicidad con peces, se precisan un mínimo de 50 individuos de la misma especie, edad y tamaño y criados en idénticas condiciones (USEPA, 1981).

Entre las pruebas que utilizan bacterias destaca, por su mayor uso, el bioensayo de toxicidad con la *Photobacterium phosphoreum* (Wong et al., 1995; Guzzela et al., 1996; Long et al., 1996; Karuppiah y Gupta, 1996; Karuppiah et al., 1997). El amplio uso del bioensayo con esta bacteria radica en su alta sensibilidad a una gran variedad de compuestos tóxicos, incluso cuando están presentes en bajas concentraciones, y en la elevada correlación que se ha observado entre este bioensayo y otros tradicionales (Giesy y Hoke, 1989; Kaiser y Palobrica, 1991).

La *Photobacterium phosphoreum* es una bacteria marina natural que, en un medio libre de tóxicos, emite luz como consecuencia de su proceso

metabólico. En medios tóxicos, los contaminantes interfieren en su sistema enzimático, la bacteria enferma o muere y se reduce la emisión de luz en proporción directa al grado de toxicidad de la muestra.

La toxicidad relativa se calcula a través de la CE_{50} , es decir, la concentración efectiva de muestra que reduce la emisión de la luz de las bacterias al 50%. También puede expresarse en unidades de toxicidad por gramo (UT/g) que se calcula de la siguiente forma:

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

Los ensayos en muestras sólidas, como sedimentos o suelos, tradicionalmente se han basado en la determinación de la toxicidad en un lixiviado de las mismas (Morillo et al., 1997). En este caso, los resultados obtenidos dependen, en gran medida, de las condiciones experimentales en las que se realiza la lixiviación (tiempo de extracción, pH, etc.) así como del reactivo utilizado (agua destilada, agua con ácido acético, etc.). Para obviar estos inconvenientes, en los últimos años se ha desarrollado un método en el que las bacterias se ponen en contacto directo con las partículas del sedimento, en una suspensión con agua y, posteriormente, se separan las partículas antes de medir la intensidad luminosa. Esto último tiene como objetivo evitar que las partículas interfieran en la medida, ya que son capaces de dispersar y absorber parte de la luz emitida por las bacterias.

Este tipo de ensayo fue utilizado por primera vez por Brouwer et al. (1990), que emplearon la centrifugación para separar las partículas de la solución con bacterias. Con posterioridad este método ha experimentado notables mejoras, como son el empleo de filtros especiales para separar las partículas (Microbics Corp., 1992), y las modificaciones realizadas por Svenson et al. (1994, 1996a, 1996b), que permiten eliminar la influencia de la turbidez residual de la solución filtrada en la medida de la luminosidad.

2.4 BIOINDICADORES DE LA CONTAMINACIÓN AMBIENTAL.

Se entiende por bioindicadores todos aquellos seres vivos que de alguna forma responden al conjunto de contaminantes que hay en el medio, y cuya respuesta somos capaces de identificar de alguna forma. Existen bioindicadores tanto para la contaminación atmosférica como para la contaminación de las aguas, sin embargo es el medio acuoso donde se han desarrollado un mayor número de métodos y es donde los bioindicadores tienen mayor relevancia industrial y sanitaria. Por otra parte en el medio acuoso existen métodos estandarizados, que pueden dar resultados reproducibles y comparables, mientras que no hay métodos estandarizados para los bioindicadores atmosféricos.

Como ejemplo de bioindicadores atmosféricos tenemos los líquenes que cambian la coloración cuando la atmósfera está perceptiblemente contaminada; también era común antes utilizar animales, como pájaros, para detectar atmósferas nocivas para la salud humana.

Hay muchos ejemplos de bioindicadores en medio acuoso, tanto para efluentes industriales, como para aguas receptoras “dulces” y saladas, como el agua de mar. Los organismos que se utilizan como bioindicadores incluyen peces, crustáceos, bacterias, plantas superiores, etc.

La calidad del agua es una constante preocupación, por el riesgo que supone para la contaminación industrial o agrícola. Para detectar los contaminantes, a menudo presentes en bajas concentraciones, algunos equipos observan su efecto sobre los peces, las bacterias e incluso sobre los vegetales. Su comportamiento refleja las alteraciones del agua.

Los bioindicadores no solo se utilizan para aguas destinadas a la industria o la agricultura, sino en todo tipo de aguas, como por ejemplo el estudio realizado en la costa de Málaga (Dpto. Biología Colegio Maravillas y Dpto. Biología U.N.E.D de Málaga, 1999), este estudio tenía

como finalidad demostrar que los vertidos continuos de la industria hostelera y el aumento de la población durante los meses de verano en la costa, están relacionados con la fauna presente o ausente en el litoral. Para ello se utilizaron 17 zonas a lo largo del litoral y la presencia o ausencia de 20 especies de equinodermos en las mencionadas áreas mediante la utilización del índice de “Jacard” y la utilización de dendrogramas de afinidades entre áreas y organismos (método de U.P.G.M.A), se pudo verificar la existencia de tres grupos de playas con distinto grado de diversidad biológica. De la misma manera, se agruparon las 20 especies de equinodermos en tres grupos que se distribuyen en zonas de distinto grado de contaminación por vertidos.

2.5 *BALANUS SSP.*

El organismo estudiado en este trabajo es el *balanus ssp.* (denominado comúnmente escaramujo) En la zona estudiada las especies más abundantes son el *Balanus balanus* y el *Balanus crenatus*, Se trata de un crustáceo de la familia de los cirrípedos y tiene dos características de gran importancia desde el punto de vista del estudio realizado: por un lado, es un animal sedentario que vive adherido a superficies que se encuentran en la zona intermareal como rocas, pilotes, muelles, etc. (por lo que pueden ser fácilmente capturados durante la marea baja) y, por otro lado, tienen una gran capacidad de acumular metales.

Los cirrípedos son el único grupo sésil de crustáceos. Aproximadamente dos tercios de las casi 900 especies descritas son forma de vida libre, que se adhieren a las rocas, conchas, corales, las latas flotantes y otros objetos. La larva cipris de un cirrípedo, se asienta en el fondo y se adhiere al sustrato por medio de glándulas cementantes y se caracterizan por ir recubiertos por placas calcáreas. La abertura del caparazón se dirige hacia arriba y permite al animal extender sus largos apéndices torácicos para recoger el plancton.

Los cirrípedos de vida libre, o torácicos, pueden dividirse en pedunculados, dentro de esta familia se encuentran los conocidos percebes, y sentados, que es la familia a la que pertenece el *balanus* ssp. Los cirrípedos sentados no tienen pedúnculo (Figura 5). La superficie inferior del cirrípedo se llama base, y puede ser membranosa o calcárea. Esta es la región preoral del animal y la que contiene las glándulas cementantes. Una pared vertical de placas rodea por completo al animal, y dentro de esta pared, el animal esta cubierto por un opérculo, formado por los pares de tergos y escudos móviles. (Figura 6).

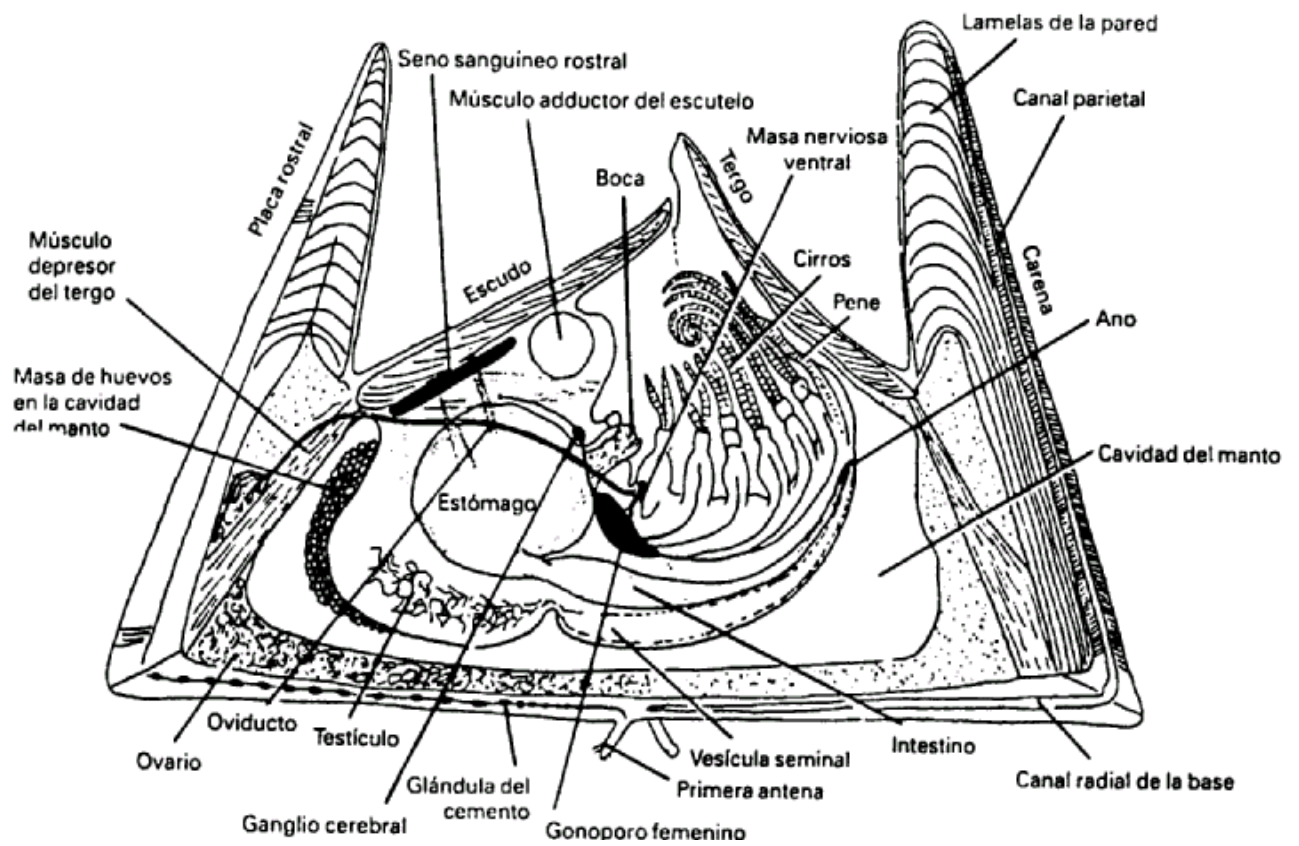


Figura 5: Sección vertical de un *Balanus* (cirrípedo sentado)

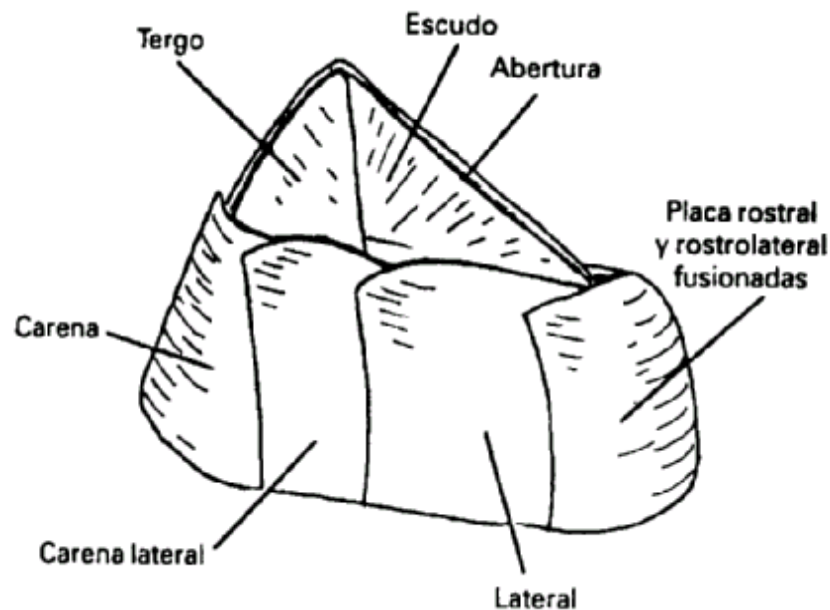


Figura 6: Número y posición de las placas de la concha en los *Balanus*.

Aunque hay algunos balanomorfos de profundidad, el grupo en conjunto es intermareal (la gran superficie de fijación, y la baja y pesada pared circular hacen que los cirrípedos sentados estén muy adaptados a la vida en rocas intermareales sometidas al barrido de la corriente y los golpes de las olas), o por lo menos submareal, con las especies restringidas a zonas particulares. Algunas están restringidas al límite de bajamar, y otras viven en la zona intermareal media. Unas pocas están adaptadas a vivir en la zona de salpicadura en el límite de la pleamar, o sobre rocas que se ven sometidas al oleaje. Los cirrípedos intermareales suelen darse en números enormes, como se indica en la tabla 5, que da la localización y estado de agregación de dos especies de cirrípedos en la costa inglesa. Los cirrípedos son menos notables en costas rocosas tropicales, quizá debido a las prolongadas temperaturas elevadas que han de ser toleradas en los niveles intermareales superiores.

Tabla 5: Distribución vertical de dos especies de *balanus* sésiles de la costa de Plymouth, Inglaterra (Hickman et al., 1999)

Altura por encima de la línea litoral media	Número de individuos por metro cuadrado					
	<i>Balanus balanoides</i>			<i>Chtamalus stellatus</i>		
	Adultos	Juveniles	Total	Adultos	Juveniles	Total
+3,4 m	0	0	0	0	0	0
+2,7 m	0	0	0	15,200	9,200	24,400
+1,8 m	0	400	400	54,000	38,000	92,000
+0,8 m	4,000	12,400	16,400	55,600	35,200	90,800
-0,2 m	40,400	20,400	60,800	400	4,800	5,200
-2,1 m	0	0	0	0	0	0

Muchos cirrípedos sentados se han adaptado a la vida en otras superficies distintas de las rocas; algunas especies han colonizado las hierbas intermareales y los manglares.

Los cirrípedos constituyen uno de los obturadores más problemáticos de cascos inferiores de barcos, boyas y pilotes, y muchas especies han sido transportadas por todo el mundo, pegadas a los barcos.

Los crustáceos se alimentan por filtración. El filtro se compone siempre de setas exoesqueléticas muy próximas entre sí, dispuestas comúnmente como los dientes de un peine. El peine se sitúa en uno o en varios pares de apéndices (para los cirrípedos estos apéndices se denominan cirrios), de manera que la corriente filtradora es producida por el batido de determinados apéndices, de esta forma capturan el plancton y el fitoplancton (ver Figura 7). Muchos cirrípedos se alimentan de plancton de pequeño tamaño, pero al menos algunos de estos, como

Balanus improvisus y *Balanus balanoides*, filtran plancton grande y pequeño. Los cuatro últimos pares de cirros realizan el movimiento de barrido y capturan partículas de varios micrómetros de diámetro. La corriente de agua producida por este barrido es dirigida sobre los dos primeros pares de cirros, que permanecen dentro de la cavidad del manto y cercanos a la boca. Estos cirrios anteriores tienen las setas dispuestas de forma muy conspicua, de modo que capturan partículas más finas, como fitoplancton, de la corriente de agua.

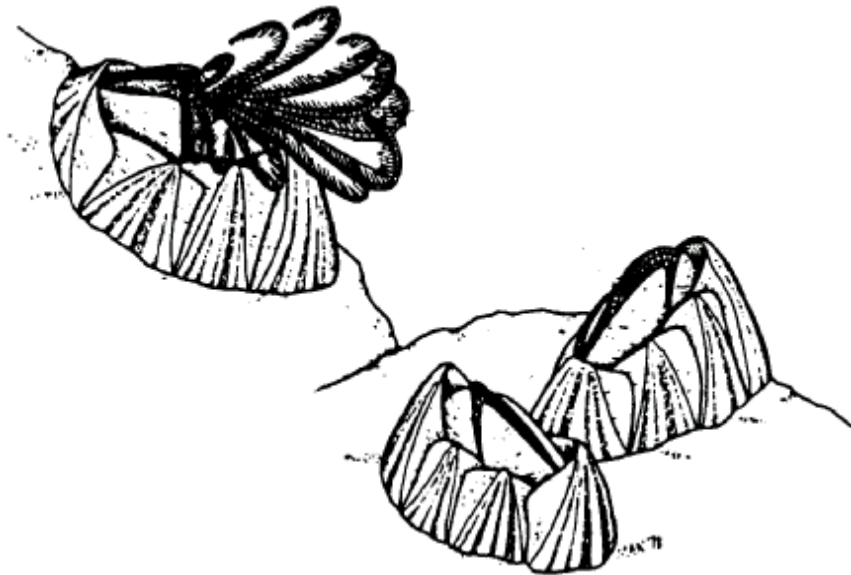


Figura 7: *Balanus* con los cirrios desplegados

Los cirrípedos torácicos, dentro de los cuales se encuentra la especie estudiada, son en su mayoría hermafroditas, el único gran grupo entre los crustáceos con este carácter.

El periodo de incubación de los huevos para el género *balanus* es de unos 6 meses, por ejemplo, para el *Balanus balanoides*, los huevos se fecundan en otoño y son incubados hasta marzo. En la mayoría de las especies, la fase que eclosiona es una nauplio. Tras seis estados naupliares, sucederá una larva cipris, que no se alimenta. Todo el

cuerpo esta encerrado dentro de un caparazón bivalvo y posee un par de ojos compuestos sésiles y seis pares de apéndices torácicos. La cipris es la fase que se asienta y se fija a un sustrato adecuado, primero de forma temporal, con las secreciones de los discos localizados en las primeras antenas, y luego de forma permanente, por medio de las glándulas cementantes antenales.

Existen una serie de factores que parecen incrementar la probabilidad de que se dé un asentamiento denso, del que dependerá la reproducción del adulto. Se ha demostrado que es una proteína del exoesqueleto de los individuos más viejos la que atrae a las larvas en fase de asentamiento. La iluminación, aspereza, posición, profundidad, y película bacteriana del sustrato pueden ser importantes también en la selección, y la fijación puede darse en un sitio distinto de la primera superficie de contacto.

La mayoría de los cirrípedos que sobreviven a la alta mortalidad que sigue al asentamiento, viven de uno a diez años. *Balanus glandula*, en la costa pacífica de los Estados Unidos, produce de dos a seis puestas de 1000 a 30000 nauplios en invierno y primavera y su esperanza de vida es de ocho a diez años (Hickman et al.,1999). Los rangos de crecimiento y longevidad están, no obstante, muy influenciados por las condiciones ambientales. La asfixia por otros individuos u organismos sésiles es una causa de muerte común.

3. TOMA Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS.

3.1. INTRODUCCIÓN.

La toma de muestras es una operación delicada, que no solo condiciona los resultados analíticos, sino que también su interpretación posterior (Rodier, 1978)

El objetivo principal de esta operación es la obtención de una porción de material, cuyo volumen sea lo suficientemente pequeño como para que pueda ser transportado con facilidad y manipulado en el laboratorio, sin que por ello, deje de representar con exactitud al material de donde procede. Este objetivo implica que éstas sean tratadas de forma que no se produzcan alteraciones significativas en su composición, antes de que se realicen los análisis correspondientes (Krajca, 1989).

3.2 TOMA Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS DE AGUA.

3.2.1 TOMA Y PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.

La elección del lugar, la profundidad y la frecuencia de las tomas se hará dependiendo de las condiciones locales y de las características del estudio (Keith, 1990).

La toma debe realizarse con cuidado, con el fin de garantizar que el resultado analítico represente la composición real. Entre los principales factores que influyen sobre los resultados, se encuentra la presencia de materia suspendida o turbidez, el método elegido para la recogida y los cambios físicos y químicos producidos por la conservación o aireación (Keith, 1990).

Existen una serie de precauciones básicas para la toma de muestras, entre las que se encuentra la de lavar los envases dos o tres veces con el agua que se va a recoger antes de llenarlo con las

muestras, a menos que dicho recipiente contenga un conservante o decolorante. Además, según los análisis que vayan a realizarse, debe llenarse el envase por completo (en la mayoría de los parámetros orgánicos) o dejar un espacio vacío para aireación, mezclas, etc.

En las muestras de aguas en las que se vayan a determinar compuestos orgánicos y metálicos, resulta necesario tomar precauciones especiales. Teniendo en cuenta que muchos de sus componentes se pueden encontrar en concentraciones del orden de microgramos por litro, cabe la posibilidad de que se pierdan total o parcialmente, si la recogida es defectuosa o no se toman las precauciones necesarias para su conservación.

Otro aspecto de vital importancia, es el tipo de envase que se debe utilizar en la toma de muestras. En general, los recipientes son de plástico o vidrio, y según los parámetros que se determinen, puede resultar preferible uno u otro de los materiales. Así por ejemplo, mientras la sílice y el sodio pueden lixiviarse en el vidrio y no en el plástico, algunos metales pueden dejar residuos adsorbidos en las paredes de los envases de vidrio. En cualquier caso, los recipientes utilizados deben asegurar, una vez tapados, la estabilidad de la muestra y su protección ante cualquier tipo de contaminación (Krajca, 1989)

En lo que respecta a la conservación, es importante señalar, que independientemente de cual sea su procedencia, una completa e inequívoca conservación de la muestra es imposible en la práctica. Resulta sumamente complicado conseguir la estabilidad completa de todos los componentes de una muestra; en el mejor de los casos las técnicas de conservación retrasan los cambios químicos y biológicos que inevitablemente se producen después de la toma. Este hecho ha llevado a la necesidad de determinar ciertos parámetros del agua “in situ” (Hellman, 1987).

Resulta imposible establecer con exactitud el tiempo máximo que puede transcurrir entre la toma de muestra y su análisis, ya que depende

del carácter de la muestra, del tipo de análisis a realizar y de las condiciones de conservación. En general, los resultados analíticos serán más fiables cuanto menor sea este periodo de tiempo.

Frecuentemente, no es posible realizar los análisis de manera inmediata una vez que la muestra se encuentra en el laboratorio; en estos casos debe mantenerse a la menor temperatura posible sin que llegue a congelarse y en la oscuridad para minimizar la volatilización o biodegradación de sus componentes. Los conservantes químicos solo deben utilizarse una vez que se haya demostrado que no interfieren en la determinación analítica posterior. En caso de que se utilicen, se añaden al recipiente antes que la muestra en cuestión, con objeto que el volumen completo de la misma, entre en contacto con el conservante en el momento de la toma (ISO 5667/3).

Es de destacar, que no existe ningún método de conservación que resulte completamente satisfactorio. En general, son relativamente limitados y están diseñados con el fin de retardar la acción de los microorganismos, retrasar la hidrólisis de los compuestos y complejos químicos y reducir la volatilidad de los componentes (Keith, 1990).

Estos métodos se limitan al control del pH, la adición de conservantes químicos, el uso de envases de ámbar u opacos, la refrigeración, la filtración y la congelación. En la 6, se enumeran los distintos métodos de conservación, envases recomendados y tiempo máximo aconsejado hasta el análisis, en base a los parámetros químicos a determinar (ISO 5667/3).

Tabla 6: Toma y preservación de las muestras de agua

PARÁMETRO	ENVASE	MÉTODO DE CONSERVACION	TIEMPO MÁXIMO
Conductividad	P, V	Refrigeración 2-5 °C	28 días
pH	P, V	Analizar lo antes posible	2 horas
Temperatura	P, V	Analizar inmediatamente.	Ninguno
Oxígeno disuelto	P,V	Analizar lo antes posible	Ninguno
Acidez/Alcalinidad	P,V	Refrigeración 2-5 °C	24 horas
Carbono orgánico total	V	Acidificar a pH<2 con H ₂ SO ₄ y refrigerar entre 2-5 °C	24 horas
Detergentes	V	Acidificar a pH<2 con H ₂ SO ₄ y refrigerar entre 2-5 °C	48 horas
Fosfatos	V(A)	Refrigeración 2-5 °C	48 horas
Sulfatos	P, V	Refrigeración 2-5 °C	1 semana
Nitratos	P(A), V(A)	Acidificar a pH<2 con H ₂ SO ₄ y refrigerar entre 2-5 °C	24 horas
Nitritos	P, V	Refrigeración 2-5 °C	Ninguno
Nitrógeno amoniacal	P, V	Acidificar a pH<2 con H ₂ SO ₄ y refrigerar entre 2-5 °C	24 horas
Metales disueltos (excepto mercurio)	P(A), V(A)	Filtrar inmediatamente y añadir HNO ₃ hasta pH<2	6 meses
Mercurio	P(A), V(A)	Acidificar a pH<2 con H ₂ SO ₄ y refrigerar entre 2-5°C	6 meses

P: polietileno; V: vidrio; (A): lavado con HNO₃ 1:1

3.2.2 TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS PARA LA DETERMINACIÓN DE METALES.

Resulta frecuente la necesidad de emplear tratamientos preliminares en las muestras a las que se les va a determinar su contenido en metales, así, se describen métodos apropiados de tratamiento preliminar en función de la técnica de análisis de metales seleccionada (Bone y Hibbert, 1979).

La determinación de metales traza en agua de mar, presenta una serie de limitaciones debido a la necesidad de cuantificar concentraciones extremadamente bajas y a los problemas que ocasiona una matriz con un 3,5% de sólidos disueltos. En estas condiciones, es frecuente la necesidad de utilizar técnicas orientadas a preconcentrar elementos traza y separarlos de componentes interferentes, como son elevados contenidos en sales, en las medidas analíticas; así se consiguen salvar los problemas de matriz y mejorar los límites de detección (Sturgeon et al. 1980; Magnusson y Westerlund, 1981).

Entre las técnicas más idóneas de preconcentración podemos destacar las siguientes:

- Extracción líquido-líquido:

Los procedimientos con solventes son ampliamente usados para la determinación de metales traza en agua de mar. La extracción se realiza con algún disolvente orgánico (metilisobutilcetona, cloroformo, etc.), donde el metal previamente complejoado con agentes quelantes es muy soluble (Rasmussen 1981). En ocasiones, resulta conveniente realizar una segunda extracción en medio acuso ácido, con el fin de evitar que el metal quede disuelto en una matriz orgánica (Magnusson y Westrlund, 1980).

Los métodos estándar primerizos se han basado en la complejizacion del metal con pirolidin ditiocarbamato de amonio (APDC), y posterior extracción con metilisobutilcetona (MIBC) (Brooks et al.,

1967; Jan y Young, 1978). Ésta es la mas utilizada en la actualidad, ya que presenta como ventajas, una mayor rapidez en la realización de los análisis, los pocos pasos que supone y un uso mínimo de reactivos (Rasmussen, 1981). Este método se utiliza para la determinación de Ag, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb y Zn, en aguas. El extracto resultante se lleva directamente al equipo de medida. Este procedimiento tiene la ventaja añadida de que, al menos, parte de los componentes de la matriz se quedan en el disolvente acuoso, lo que produce a menudo una reducción de las interferencias.

No obstante, Kinrade y Van Loon (1974) estudiaron en detalle la extracción con APDC-MIBC y optaron por añadir dietilditiocarbamato de dietilamonio en combinación con APDC, para mejorar la estabilidad del complejo y ensanchar el rango de trabajo de pH permitido. Pero el análisis del extracto por espectroscopía de absorción atómica de llama se vio limitado por la pobre estabilidad de los complejos de ditiocarbamato (DTC) en MIBC.

Danielson et al. (1978) y Jan & Young (1978) superaron este inconveniente desarrollando una etapa adicional de re-extracción ácida para transferir los metales acomplejados con DTC a una fase acuosa, acidificada y estable.

En el caso de que se trabajase posteriormente con un espectrofotómetro de absorción atómica de cámara de grafito en lugar del de llama, no se acostumbra a usar MIBC como solvente debido a su significativa miscibilidad con agua, lo que supondría una interferencia de la matriz por exceso de sales. Entre las mejores propuestas, cabe destacar la presentada por Sachsenberg et al. (1992) que propuso una extracción simple con disobutilcetona (DIBC). Esta técnica produce factores de preconcentración elevados a partir de volúmenes de muestra relativamente pequeños, pero se ve limitada por el rango de metales que permite determinar (Batterham y Parry, 1996).

- Adsorción sobre carbono activo.

En presencia de determinados agentes complejantes, como es el caso de la 8-hidroxiquinoleína, las partículas de carbón activo tienen la capacidad de adsorber simultáneamente diversos metales con rendimientos satisfactorios y elevados valores de concentración (Peláez 1995; Sturgeon et al., 1982).

- Electrodeposición.

En esta técnica de concentración, las formas metálicas reducidas son depositadas electroquímicamente sobre un metal o un electrodo pirolítico de grafito. Este procedimiento se utiliza frecuentemente cuando la determinación de metales se realiza mediante la activación neutrónica (De Soete et al., 1972).

- Intercambio iónico.

Los cambiadores de iones son redes tridimensionales de macromoléculas insolubles, con ciertos radicales ionizables fijos por unidad estructural. Estas sustancias sólidas pueden tomar iones de una disolución y ceder otros de la misma carga en cantidad equivalente, lo que permite cambiar la composición electrolítica de una disolución sin la introducción de especies iónicas indeseables.

El cambio iónico es una técnica sencilla y eficaz; su uso se ha extendido continuamente, y no existe ninguna rama de la Química que no se beneficie de este procedimiento de separación. Su aplicación más antigua es el tratamiento de aguas, y la más moderna la separación de compuestos orgánicos y, en especial, de los aminoácidos, cuyo análisis automático por cambio iónico se realiza en laboratorios diariamente especializados de todo el mundo (Pérez, 1973).

Los intercambiadores iónicos se hayan constituidos por grupos unidos por covalencia a una matriz soporte. La naturaleza química de los grupos cargados determina los tipos de iones que se unen al

intercambiador iónico y la fuerza con la que se unen. Las propiedades químicas y mecánicas de la matriz soporte condicionan las características de flujo, la accesibilidad del ion y la estabilidad del intercambiador iónico.

Como matrices soporte para los intercambiadores iónicos se emplean, en general, tres clases de materiales: resinas, celulosa y geles (Voet y Voet, 1994).

Los geles y la celulosa han demostrado una elevada eficacia en la separación de proteínas y de otras macromoléculas, muy superior a las de las de resina de intercambio iónico que se emplean rutinariamente en la separación de moléculas pequeñas. Y salvo por el desarrollo en la última década de colectores de celulosa (modificados o no) capaces de preconcentrar iones metálicos en medios acuosos incluso en soluciones salinas (Padilha et al., 1997), nos centraremos en el estudio de las resinas por su especial interés en la preconcentración de metales en aguas:

Las resinas son polímeros insolubles obtenidos por condensación o adición de moléculas orgánicas sencillas. Son poco estables en general. No resisten altas temperaturas, ni a la radiación. Resisten sin embargo la acción de ácidos fuertes no oxidantes y de las bases fuertes.

Según la función que realizan, las resinas pueden clasificarse en:

- Resinas catiónicas. Tienen en su esqueleto polimérico grupos aniónicos fijos capaces de intercambiar cationes. Según el tipo de anión, puede ser de ácido fuerte o ácido débil.
- Resinas aniónicas. Tienen grupos catiónicos fijos. Generalmente nitrogenados, que pueden intercambiar aniones. Pueden ser de base fuerte o de base débil.

- Resinas bifuncionales. Se trata de polímeros con dos tipos de grupos activos, de tipo ácido o de tipo básico.

El proceso de intercambio iónico ocurre realmente en cinco etapas, tal como se representa en la figura 8 (Pérez, 1973):

- Etapa 1: difusión del ion hasta la perla de resina.
- Etapa 2: difusión del ion en el interior de la resina hasta encontrar el grupo activo.
- Etapa 3: intercambio químico entre ambos iones.
- Etapa 4: difusión del grupo activo sustituido en el interior de la resina hasta la superficie de la perla.
- Etapa 5: difusión del grupo activo sustituido a la disolución atravesando la película estacionaria de disolvente, y difundiéndose en la disolución exterior.

Por el principio de la electroneutralidad, las etapas 1 y 5 deben ocurrir simultáneamente, al igual que las etapas 2 y 4, el intercambio químico (etapa 3) es el paso más rápido, por lo que puede establecerse que el paso determinante de la velocidad es la difusión de los iones. El cambio iónico es, pues, un fenómeno fundamentalmente de difusión.

Existirán dos pasos que podrán determinar la velocidad:

- Interdifusión de iones en la película estacionaria.
- Interdifusión de iones en el interior de la perla de resina.

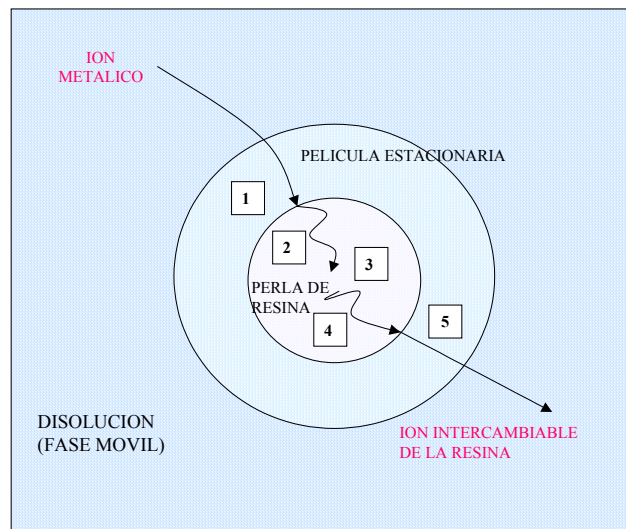


Figura 8: Etapas asociadas al proceso de intercambio iónico (Pérez, 1973).

3.3 TOMA Y TRATAMIENTO DE MUESTRAS DE *BALANUS SPP.*

3.3.1 TOMA Y PRESERVACIÓN DE LAS MUESTRAS.

Los procedimientos de marisqueo más frecuentes en la provincia de Cádiz, suelen clasificarse en tres modalidades:

- Marisqueo a pie
- Marisqueo a flote en los ríos
- Marisqueo a flote en el litoral.

La orden de 25 de marzo de 1970, sobre “Normas para la exploración de los bancos naturales y época de veda de marisco”, reglamenta las artes y utensilios de marisqueo. Sin embargo, suelen emplearse tipos de rastros distintos a los citados en dicha orden en función de las especies a capturar, zona, fondos, etc. Los instrumentos se han ido perfeccionando con el tiempo, tratando de lograr el mayor redimiendo para el mariscador.

El *balanus spp.* es un organismo sedentario que se adhiere fácilmente a rocas, muelles, pilotes, etc. Y que como hemos mencionado con anterioridad vive en la zona intermareal. El *balanus spp.* es capturado durante la bajamar, que es cuando quedan al descubierto y visibles. Dicha captura se podrá realizar a pie, o bien requiriendo el uso de un barco, este hecho dependerá del punto de muestreo seleccionado.

Para separar el *balanus spp.* de la superficie a la cual se encuentra adherido se utilizan todo tipo de utensilios como son espátulas, cuchillos, etc., siempre que el material del cual estén hechos no dé lugar a una contaminación de las muestras.

La preparación y preservación de las muestras incluye el proceso que se sigue desde la toma de muestras hasta su ataque y análisis. Las muestras pueden mantenerse refrigeradas hasta su análisis, en cuyo caso éste deberá realizarse tan pronto como sea posible, o también se pueden congelar, lo cual nos permite alargar el tiempo para la realización de los análisis, así, si una muestra es congelada podrá permanecer al menos durante dos meses en dichas circunstancias sin riesgo de estropearse.

3.3.2 TRATAMIENTO EN LAS MUESTRAS PARA DETERMINACIÓN DE METALES.

Si bien algunas técnicas analíticas (análisis por activación neurótica, fluorescencia de rayos X, etc.) no requieren tratamiento previo de las muestras, en otras es necesario proceder a la destrucción de la materia orgánica y a su posterior disolución. Este tratamiento puede realizarse de tres formas:

Por vía seca: La muestra se introduce en una cápsula de porcelana o de platino y se calcina durante dos horas a 525°C (se ha comprobado que por encima de 550°C la recuperación de algunos metales es bastante deficitaria), hasta conseguir la mineralización total de la misma. Las cenizas resultantes se tratan con ácidos o mezclas de estos para proceder a su disolución (Shiber J.G, 1985).

Por vía húmeda en recipientes abiertos: La muestra se calcina a reflujo con diversos flujos disgregantes, cuya selección depende ante todo de la naturaleza de la muestra y de los objetivos del análisis (Fowler S.W y Oregioni B, 1976; Cordon P.R, 1985; Shulz-Baldes M, 1974).

Por vía húmeda en recipientes cerrados: En la actualidad y con objeto de evitar la pérdida de metales y de aumentar la eficacia del ataque, se utilizan recipientes cerrados para disolver la muestra. La combinación de temperatura y presión elevadas hace que el ataque sea más enérgico. Se utilizan recipientes de teflón y de cuarzo. El empleo de hornos microondas, se esta extendiendo entre la mayoría de los laboratorios. Pueden estar provistos de módulos de apertura y cierre automáticos. Además de homogeneizar al máximo la temperatura, obteniéndose ataques más homogéneos, depende en menor medida de las alteraciones externas del medio (Stripp R.A y Bogen D.C, 1989; Stripp R.A et al.; 1990).

En la tabla 7 se incluyen los flujos disgregantes más utilizados en la disolución de muestras de moluscos y crustáceos.

FLUJO DISGREGANTE
HNO ₃
HNO ₃ - HCl ₄ (3:1 v/v)
HNO ₃ - H ₂ SO ₄
HNO ₃ - HCl (1:2 v/v)
[HNO ₃ - H ₂ SO ₄ (2:1 v/v)] + H ₂ O ₂
[HNO ₃ - H ₂ SO ₄] + K ₂ Cr ₂ O ₇
HNO ₃ + H ₂ O ₂
HNO ₃ - HClO ₄ (2:1 v/v)
HNO ₃ - HClO ₄ - H ₂ SO ₄

Tabla 7: Flujos disgregantes utilizados en ataque de moluscos y crustáceos (Shiber, 1985; Comisión of the European Communities, 1988; BOE nº 195, 1991; Enk et al, 1997; Brix et al , 1985).

4. MÉTODOS DE ANÁLISIS.

4.1 INTRODUCCIÓN.

En la actualidad existe una gran variedad de técnicas y métodos analíticos que permiten la determinación de los niveles de contaminación de los ecosistemas acuáticos. En este capítulo se describen los principales métodos de determinación de metales en aguas.

4.2 DETERMINACIÓN DE METALES.

Los metales se pueden determinar de forma satisfactoria utilizando diversas técnicas analíticas tales como absorción atómica, plasma acoplado inductivamente, activación neutrónica, espectroscopía de masas, fluorescencia de rayos X, polarografía, etc. (Skoog y Leary; 1994) (Tabla 8).

Los métodos de espectroscopía de absorción atómica incluyen técnicas electrotérmicas y de llama. En general, los métodos de llama se aplican en el caso de concentraciones moderadas en sistemas de matrices simples y complejas. Los métodos electrotérmicos tienen mayor sensibilidad cuando los efectos de matriz no son demasiado intensos, si bien algunos de estos efectos pueden llegar con modificadores de matriz, o con sistemas de corrección de fondo (Storea y Kahn, 1982), como el basado en el efecto Zeeman (Fernandez et al., 1980; Grobensky et al., 1984).

Tabla 8 : Técnicas de análisis para la determinación de metales

METAL	TECNICAS DE ANALISIS
Arsénico	- Espectroscopía de absorción atómica con generación de hidruros. - Espectroscopía de inducción por plasma. - Activación neutrónica. - Fluorescencia de rayos X.
Cadmio	- Espectroscopía de absorción atómica con llama o cámara de grafito. - Espectroscopía de inducción por plasma. - Volumétrica.
Cinc	- Espectroscopía de absorción atómica con llama - Polarografía. - Activación neutrónica.
Cobre	- Espectroscopía de absorción atómica con llama o cámara de grafito. - Fluorescencia de rayos X. - Volumétrica.
Cromo	- Espectroscopía de absorción atómica con llama o cámara de grafito. - Espectroscopía de inducción por plasma. - Activación neutrónica. - Fluorescencia de rayos X.
Hierro	- Espectroscopía de absorción atómica con llama. - Volumétrica.
Manganeso	- Espectroscopía de absorción atómica con llama o cámara de grafito. - Volumétrica. - Activación neutrónica.
Mercurio	- Espectroscopía de absorción atómica mediante la técnica de vapor frío. - Espectroscopía de inducción por plasma. - Activación neutrónica. - Volumétrica. - Fluorescencia de rayos X.
Níquel	- Espectroscopía de absorción atómica con llama o cámara de grafito. - Polarografía.
Plomo	- Espectroscopía de absorción atómica con llama o cámara de grafito. - Espectroscopía de inducción por plasma. - Potenciometría.
Plata	- Espectroscopía de absorción atómica con llama o cámara de grafito. - Volumétrica.

La técnica de plasma acoplado inductivamente (ICP) presenta algunas ventajas respecto de los métodos de llama y electrotérmicos. Permite realizar análisis multielemental como consecuencia de obtener buenos espectros para la mayoría de los elementos con las mismas condiciones de excitación, determinar no metales como cloro, yodo y azufre, y aplicarse en unos intervalos de concentración que abarcan varios órdenes de magnitud. Son equipos con elevados costes de inversión y de operación, y en general, los límites de detección son superiores a los de los métodos electrotérmicos (Skoog y Leary, 1994). En los últimos años han comenzado a utilizarse el sistema ICP-MS, que combina un plasma acoplado inductivamente con un espectrómetro de masas, con lo que consiguen unos límites de detección extraordinariamente bajos (McLaren et al., 1987; Denoyer, 1992; Payá-Perez et al., 1993).

Entre los métodos que pueden emplearse en el análisis de metales, el más utilizado en la actualidad es la espectroscopía de absorción atómica, como consecuencia de las siguientes características de interés (USEPA, 1983):

- 1) Permite el análisis de un elevado número de elementos metálicos.
- 2) Es un método sencillo y barato.
- 3) Presenta pocas interferencias espectrales y, en tales casos, son bien conocidas y fácilmente controlables.
- 4) Permite obtener bajos límites de detección, especialmente para elementos que tienen sus líneas principales de absorción en las longitudes onda cortas.
- 5) Tienen una considerable versatilidad, tanto en lo concerniente al tipo de muestra como a las concentraciones de los elementos analizar.