

INFORME FINAL PROYECTO INVESTIGACIÓN CENIZAS 2

CÓMO AFECTAN LOS CONTAMINANTES DE LAS CENIZAS DE INCENDIOS FORESTALES A LOS ECOSISTEMAS DE LA RÍA DE VIGO, MEDIDOS A TRAVÉS DE ANÁLISIS QUÍMICOS Y ENSAYOS DE TOXICIDAD EN LA EMBRIOGÉNESIS DEL ERIZO DE MAR (PARACENTROTUS LIVIDUS)

Universidade de Vigo



Universidade de Vigo
Dpto. Química Analítica e Alimentaria

Asociación Agua y Nutrición



ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.	4
2. MATERIAL Y MÉTODOS.	5
2.1. Recogida de muestras.	3
2.2. Procesado de muestras para análisis químicos.	4
2.3. Preparación de los elutriados.	4
2.4. Determinación de la materia orgánica en el sedimento	5
2.5. Alcalinidad de las muestras de cenizas.	
2.6. Análisis de Ca ²⁺ .	6
2.7. Extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) en agua de mar.	7
2.7.1. <i>Extracción en Soxhlet.</i>	7
2.7.2. <i>Purificación de la muestra (clean-up).</i>	8
2.7.3. <i>Medida de las concentraciones.</i>	9
2.8. Bioensayo de embriogénesis de erizo de mar.	9
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	13
3.1. Parámetros físico-químicos de los elutriados obtenidos con las cenizas y agua de mar filtrada.	13
3.2. Alcalinidad.	13
3.3. Concentraciones de Ca ²⁺ .	14
3.4. Concentración de materia orgánica.	
3.5. Concentraciones de PAHs.	15
3.6. Bioensayos de toxicidad.	17
4. CONCLUSIONES	25
5. BIBLIOGRAFÍA.	26

1. INTRODUCCIÓN.

Los incendios forestales representan una amenaza para el medioambiente, los recursos naturales, y las infraestructuras (Smith *et al.* 2011), sobre todo, en zonas donde el agua es escasa y las precipitaciones limitadas en el espacio y tiempo (Vila *et al.* 2007).

Durante estos eventos, la temperatura de los suelos aumenta considerablemente, lo cual provoca cambios en su composición química, como por ejemplo el aumento de las concentraciones de compuestos prioritarios como Ca, Mg, Na, K y otros iones como el carbonato y el amonio (Mahendra *et al.* 1993, Aronsson y Ekelund 2004, Covington y Sackett, 1992, Etitgni y Campbell, 1991). Esto, unido a los arrastres de material edáfico producidos por escorrentía, repercute negativamente a la calidad de las aguas próximas a la zona afectada (Neary *et al.* 2005, Cancelo *et al.* 2013; Cancelo y Díaz, 2018).

Además, tras estos procesos de combustión, también se introducen al medio otros compuestos tóxicos, como es el caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs, de sus siglas en inglés) (Olivella *et al.* 2006, Mastro *et al.* 2015). Estos componentes son contaminantes orgánicos que se encuentran de forma ubicua en el medio, y que se caracterizan por ser persistentes y formarse tanto de forma natural como antropogénica, siendo esta última la principal fuente de contaminación por PAHs en el medio ambiente (Douben, 2003; Pérez *et al.* 2016). Su presencia resulta preocupante, ya que representan el grupo más amplio de sustancias mutagénicas, cancerígenas y teratogénicas (IARC, 1991), además, también pueden representar una gran amenaza para el medio marino, ya que debido a su alta hidrofobicidad estas sustancias tienden a acumularse en los sedimentos marinos, y en condiciones favorables son liberadas al agua de forma continua (Chen y Chen, 2011). Los PAHs han sido poco estudiados en episodios de incendios forestales, aún estando siempre presente en la mayoría de los suelos, debido a su persistencia en los diferentes ecosistemas (Bundt *et al.* 2011). Cabe destacar que la variedad de PAHs presentes en las cenizas, está más afectada por las condiciones de la combustión que por las especies de árboles (Mastro *et al.* 2015).

En octubre de 2017 los incendios forestales ocurridos en Galicia arrasaron con más de 42.000 hectáreas (EFFIS), de las cuales 35.500 hectáreas se perdieron tan solo en dos días, el 16 y el 17 de octubre (Delgado y Vicente, 2019). El objetivo principal de este estudio es estimar los posibles daños causados en el medio marino tras estos eventos. Para ello, se realiza un bioensayo con sedimento recogido en distintas estaciones de la Ría de Vigo el 3 de noviembre de 2017, y cenizas recolectadas en dos de las zonas más afectadas por los incendios, Baiña y Matamá, cuyas características se comparan con cenizas recogidas tras la quema controlada de residuos provenientes de una poda. Este estudio se realiza con larvas de erizo de mar (*Paracentrotus lividus*) por ser un organismo sedentario, de fácil recolección, y cuyo manejo en laboratorio es sencillo (Beiras y Pérez, 2013). Además, también se realizan análisis de calcio, sulfuros, porcentaje de materia orgánica y PAHs.

En el trabajo anterior presentado a la Asociación Agua y Nutrición en octubre de 2019, se estudió el efecto tóxico que podrían tener unas cenizas, procedentes de la combustión de la madera, en el medio marino mediante la realización de un bioensayo de embriogénesis de las larvas de erizo de mar (*Paracentrotus lividus*). Asimismo, se determinó el contenido de PAHs de esas cenizas, observándose que los perfiles de estos hidrocarburos eran similares a los obtenidos en otros estudios (Mastro *et al.* 2015). Los elutriados obtenidos para ese experimento mostraron que la toxicidad provenía del alto valor de pH originado por la alta concentración de iones carbonato en las cenizas. Al diluir los elutriados, esta toxicidad fue disminuyendo, por lo que no se pudo determinar si la presencia

de otros compuestos tóxicos para las larvas de erizo, como el ion amonio y los PAHs, afectaban en el desarrollo de dichas larvas. En este estudio previo, se mencionaban las posibles vías de entrada de estos compuestos tóxicos al medio marino, que podrían ser mediante aportes atmosféricos o aportes fluviales, y los posibles filtros que tiene el medio marino para que estos compuestos entren o no en la columna de agua.

Con todo esto, se presenta un nuevo trabajo en el que se realizan los mismos estudios que en el trabajo anterior, pero con muestras de cenizas recogidas en lugares de la Comarca de Vigo donde se produjeron los incendios forestales ocurridos en octubre de 2017, así como en sedimentos recogidos en un transecto a lo largo de toda la Ría de Vigo, días después de haber ocurrido los incendios. Estas muestras fueron recogidas por investigadores del Departamento de Ecología y Biología Animal de la Universidade de Vigo. Con estos estudios se pretende confirmar si los PAHs producidos en los incendios forestales han alcanzado finalmente el medio marino y los posibles efectos tóxicos que podrían tener.

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1. Recogida de muestras.

Los sedimentos utilizados en este estudio fueron recogidos el 3 de noviembre de 2017 en 5 estaciones distribuidas a lo largo de un transecto desde el interior hacia el exterior de la Ría de Vigo, tal y como se muestra en la **Figura 1**, y cuyas coordenadas se muestran en la **Tabla 1**. Su recolección se realizó con una draga Van Veen y se tomaron tres réplicas por zona de muestreo.

Tabla 1: Localización en coordenadas de los puntos donde se realiza el muestreo de los sedimentos.

Stn 1	42° 17,690' N	8° 38,410' E
Stn 2	42° 15,800' N	8° 42,290' E
Stn 3	42° 14,098' N	8° 46,816' E
Stn 4	42° 13,000' N	8° 48,860' E
Stn 5	42° 10,067' N	8° 51,603' E

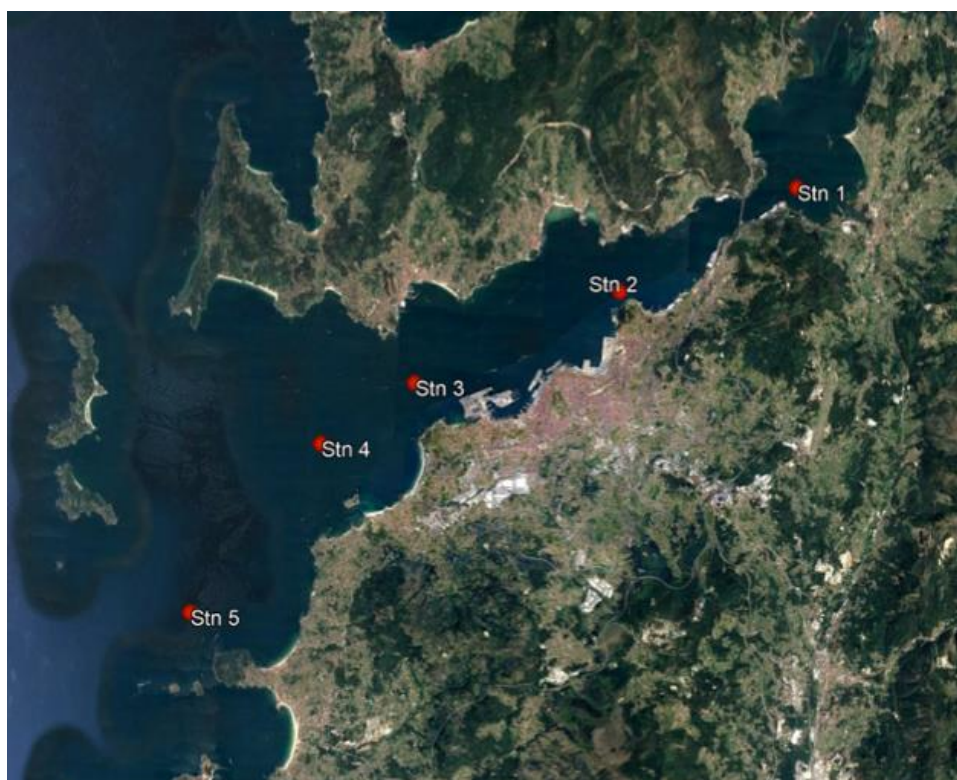


Figura 1. Localización de los puntos de muestreo de los sedimentos recogidos en la Ría de Vigo.

Las cenizas de los incendios forestales empleadas se recolectaron el 31 de octubre de 2017 tanto en Baiña, un barrio localizado en el concello de Baiona, (42,11 °N, 8,85 °E) como en Matamá, un barrio localizado cerca de la ciudad de Vigo (42,19 °N, 8,75 °E). Estas muestras de cenizas se recogieron

con una espátula de madera y junto éstas también se recogió la capa de arena superficial en contacto con las cenizas.

2.2. Procesado de muestras para análisis químicos.

Las muestras de sedimento se congelaron en un congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y fueron liofilizadas en un liofilizador modelo Alpha 1-4, de la marca Christ.

Las muestras de ceniza se secaron en una estufa a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 12-14 h y posteriormente tamizado en una tamizadora (**Figura 2a**) con un tamiz metálico de 2 mm de malla (**Figura 2b**), obteniéndose la parte del sedimento denominada “fracción total”.



Figura 2: Tamizadora (a) con un tamiz de 2 mm de malla (b).

2.3. Preparación de los elutriados.

Para la preparación de los elutriados se emplearon las metodologías estandarizadas por CEN, European Committee for Standardization (2002) y US Environmental Protection Agency (1992). Para ello, se pesan 50 g de sedimento o ceniza y se depositan en un recipiente de plástico de 500 mL. Se añade agua de mar filtrada a $45\text{ }\mu\text{m}$ (AMF) hasta rebosar, evitando así que entre la tapa y el agua quede aire. Con ayuda de una rueda giratoria se agitan los botes durante 30 minutos a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez finalizada la agitación, se dejan reposar los recipientes 12 horas a $20\text{ }^{\circ}\text{C}$ facilitando así la decantación del sedimento. Con ayuda de un tubo de silicona se sifona el sobrenadante a otro recipiente, desechándose la primera fracción y evitando que se resuspenda el material depositado en el fondo. Los preparados se burbujan con aire durante 20 minutos para eliminar los sulfuros presentes.

De esta preparación se toman 150 mL para realizar los análisis químicos correspondientes para determinar la salinidad, el oxígeno disuelto mediante el método electrométrico, el pH y amonio mediante métodos potenciométricos, y la concentración de sulfuros mediante un método colorimétrico. El resto del elutriado es almacenado a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su uso en el bioensayo. Se tiene en cuenta que, para poder realizar correctamente los bioensayos, los elutriados no deben superar los valores de los parámetros mostrados en la **Tabla 2** (Beiras y Pérez, 2013).

Tabla 2: Parámetros de la incubación recomendados para bioensayos con embriones de erizos.

Parámetros de la incubación	
Temperatura	20°C
Salinidad	> 32‰
Oxígeno disuelto	> 5 mg L ⁻¹
pH	7,0 < pH < 8,5
Amoníaco	< 40 µg L ⁻¹
Sulfuro	< 0,02 mg L ⁻¹
Fotoperiodo	Oscuridad

Además de estas preparaciones, también se realizan elutriados con las cenizas y agua ultrapura para analizar de forma independiente los carbonatos y bicarbonatos, así como la concentración de calcio, que son liberados a la fracción acuosa.

2.4. Determinación de la materia orgánica en el sedimento.

Se determina la cantidad de materia orgánica presente en las muestras por la pérdida de peso por calcinación. Para ello, se introducen 0,5 g de muestra en una mufla a 450 °C y se dejan 6 horas. Una vez finalizado este tiempo, se procede a pesar el material restante, y teniendo en cuenta el peso del crisol vacío, la cantidad exacta de muestra utilizada y el peso del crisol una vez sometido a este proceso, se calcula el porcentaje de materia orgánica presente.

2.5. Alcalinidad de las muestras de cenizas.

La alcalinidad de las muestras de cenizas se determinó a partir de los elutriados obtenidos con agua ultrapura mediante valoración con una disolución estandarizada de HCl 0,1 M. A medida que se adiciona el HCl se registra en continuo los valores de pH de la disolución. El valorador automático utilizado (**Figura 3**) permite registrar los valores de pH a medida que se adiciona la disolución valorante. Los puntos de equivalencia se obtienen mediante la representación gráfica de los valores de pH frente al volumen de HCl añadido, y con ellos se puede calcular las concentraciones de los iones carbonato y bicarbonato de cada muestra.



Figura 3: Valorador automático.

2.6. Análisis de Ca^{2+} .

El análisis de la concentración de Ca^{2+} se realiza mediante espectroscopia de emisión atómica con atomización por llama aire-acetileno. Para ello, es necesario realizar una recta de calibrado con distintas concentraciones de calcio en concentraciones exactas y conocidas en el intervalo desde 1 hasta 10 mg L^{-1} . Se preparan previamente una disolución patrón de cloruro de calcio dihidratado $0,05 \text{ M}$ y una disolución de lantano $0,1 \%$ (m/v). De estas disoluciones se toman los volúmenes de la disolución de Ca^{2+} necesarios para obtener la disolución patrón de este ion en la concentración deseada, y se les añade $250 \mu\text{L}$ de la disolución de lantano, y $250 \mu\text{L}$ de HNO_3 concentrado, enrasando a 25 mL .

Los análisis de Ca^{2+} se realiza en las muestras de los elutriados las cenizas con agua ultrapura, procedimiento que se explica en el punto 2.3. Estas muestras se filtran a vacío con un filtro de fibra de vidrio de $0,45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Posteriormente se eliminan los ácidos húmicos presentes, toman alícuotas de 25 mL que se depositan en tubos de centrifuga, se les añade $250 \mu\text{L}$ de HNO_3 y se centrifugan. A continuación, se recoge el sobrenadante y se procede al análisis de las concentraciones de Ca^{2+} .

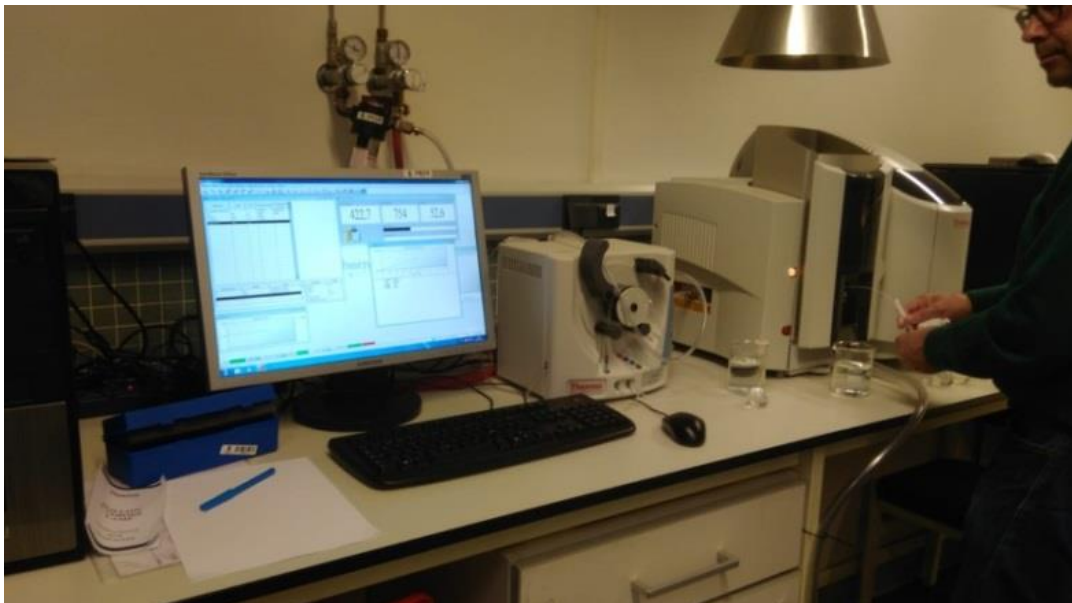
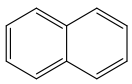
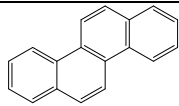
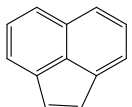
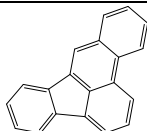
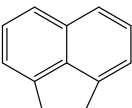
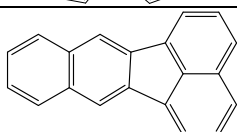
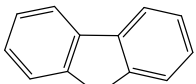
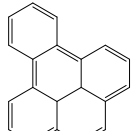
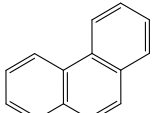
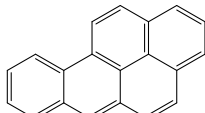
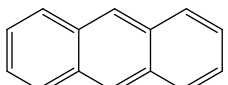
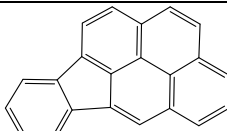
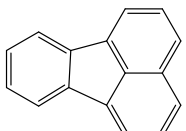
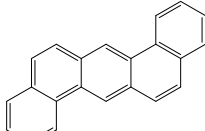
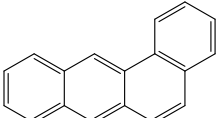
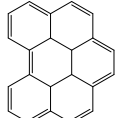
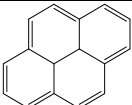


Figura 4: Espectroscopía de emisión atómica.

2.7. Extracción de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH) en agua de mar.

Los PAHs analizados en el presente estudio son los que se muestran en la **Tabla 3** y son los que se encuentran en la lista elaborada por la agencia de protección medioambiental estadounidense (US-EPA) de los hidrocarburos con mayor relevancia medioambiental

Tabla 3: Hidrocarburos aromáticos policíclicos analizados en este estudio.

Naftaleno (Naph)		Criseno (Chr)	
Acenaftileno(Aci)		Benzo[b] fluoranteno (BbF)	
Acenafteno (Ace)		Benzo[k] fluoranteno (BkF)	
Fluoreno (Flu)		Benzo[e] pireno (BeP)	
Fenantreno (Phe)		Benzo[a] pireno (BaP)	
Antraceno (Ant)		Indeno [1,2,3-c,d] pireno (Ipy)	
Fluoranteno (Fla)		Dibenzo[a,h]antraceno (DahA)	
Benzo[a] antraceno (BaA)		Benzo[g,h,i]perileno (BghiP)	
Pireno (Pyr)			

2.7.1. Extracción en Soxhlet.

Se añade a un cartucho de celulosa para extracción en Soxhlet una espátula de sulfato sódico, se pesan 0,5 g de sedimento liofilizado o de muestra de ceniza y, a continuación, se le añade de nuevo otra espátula de sulfato sódico y se homogeneiza. El sulfato sódico eliminará posibles restos de humedad de la muestra. Con ayuda de una micropipeta se añaden 0,5 mL de cloruro amónico para favorecer la extracción, y 15 μL de una disolución patrón de Pireno D10 de concentración 10 mg L^{-1} , el cual actúa

como subrogado. En un balón de Soxhlet se añaden 100 mL de una mezcla de n-hexano y acetona en una proporción 3:1, y una espátula de perlas de vidrio, se arma el equipo y se realiza la extracción durante 8 horas. Una vez transcurrido este tiempo, se trasvasa el disolvente empleado a un matraz de vidrio ámbar, se le añaden unas virutas de cobre activado para eliminar cualquier resto de sulfuro presente, dejándolo reaccionar durante 24 horas (EPA 1996). A continuación, el disolvente se evapora casi a sequedad con un rotavapor y se le añade n-hexano para realizar la purificación de la muestra mediante extracción en fase sólida.

2.7.2. Purificación de la muestra (clean-up).

La purificación de la muestra, o clean-up, se realiza de la siguiente manera: se pesa 1 g de florisil activado, y se desactiva al 10 % añadiéndole 100 μ L de agua ultrapura. Se deposita en la columna de extracción y se acondiciona con n-hexano. Se vacía la columna, sin llegar a sequedad, se añade la muestra, y se realiza la elución con un total de 50 mL de n-hexano, volumen suficiente para que las sustancias extraídas que no se corresponden con PAHs sean eliminadas de la muestra. El eluato obtenido se recoge en un matraz de evaporación y se lleva casi a sequedad con un rotavapor.

Al extracto que permanece en el matraz, se le añaden 1,5 mL de n-hexano, se homogeneiza y, con ayuda de una micropipeta, se lleva a un vial de vidrio ámbar de 1,5 mL, al cual se le añaden 15 μ L de los patrones internos benzo[a]antraceno D12 y antraceno D10. Tras ello, se procede a su análisis.



Figura 5: Purificación mediante extracción en fase sólida (clean-up).

2.7.3. Medida de las concentraciones.

El análisis de los PAHs presentes se realiza mediante la técnica de cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas GC/MS (**Figura 6**). Se realizan tres medidas con cada vial.

Las condiciones de medida son las siguientes:

Las medidas se realizaron empleando un flujo constante de He de 1 mL min^{-1} .

Inyección: se inyecta $1 \mu\text{L}$ de muestra en modo splitless con una temperatura de horno de 300°C .

Elución: comienza con una temperatura en el horno de la columna de 60°C durante 3 minutos y a continuación se aplica las siguientes ramplas de temperatura: $20^\circ\text{C min}^{-1}$ hasta 150°C , 4°C min^{-1} hasta 250°C , y 2°C min^{-1} hasta 300°C , manteniendo esta temperatura durante 3 minutos. Por lo que el tiempo total por cromatograma es de 60,5 minutos.

Detección: El horno a salida del detector está a 300°C y la detección se realiza simultáneamente en modos SIM (del inglés, single ion monitoring) eligiendo las masas más apropiadas para cada compuesto y SCAN (para la cuantificación de los compuestos).

De los cromatogramas registrados, se midieron las áreas de pico para cada compuesto, las cuales son directamente proporcionales a las concentraciones de los contaminantes en cada muestra.

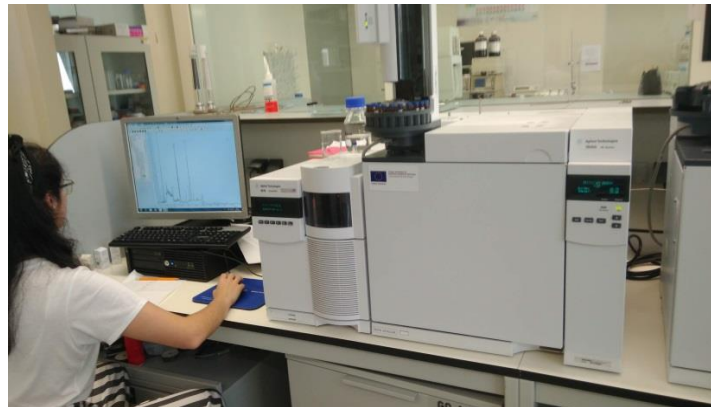


Figura 6: Cromatógrafo de gases.

2.8. Bioensayo de embriogénesis de erizo de mar.

El bioensayo de embriogénesis del erizo de mar se basa en la obtención de gametos y fecundación *in vitro* de los mismos.

El desarrollo embrionario de las larvas de erizo de mar sucede de la siguiente manera:

1. Formación de la membrana coriónica (membrana de fertilización) inmediatamente después de la fecundación (**Figura 7 a**). Esta membrana se observa fácilmente en el microscopio y permite comprobar el éxito de la fecundación. La división celular es holoblástica y radial, formándose anillos de células paralelamente distribuidos al ecuador del huevo

- Al alcanzar la división hasta las 1000 células, 7-8 horas después de la fertilización, se alcanza el estado de blástula (**Figura 7 b**). Las células de la blástula son ciliadas y el embrión comienza a tener capacidad natatoria.
- Se alcanza el estado de gástrula, 6-7 horas después de alcanzar el estado de blástula. Las células forman una capa que encierra una cavidad rellena de fluido, el blastocele (**Figura 7 c**).
- Larva prisma. Comienzan a formarse las espículas y la larva adquiere una forma triangular (**Figura 7 d**).
- Larva pluteus. Se forma a las 24 horas posteriores a la fecundación. Las espículas crecen y se forman los brazos de la larva. Se pueden diferenciar el sistema digestivo (**Figura 7 e**).



Figura 7: Medición de la longitud máxima en los distintos estadios de desarrollo del embrión de erizo de mar.

En la **Figura 8** se muestra la evolución con el crecimiento larvario con el tiempo de incubación. La larva comienza a alimentarse a partir de las 72 horas posteriores a la fertilización. Durante las horas posteriores tras alcanzar el estadios de larva pluteus, la larva únicamente aumenta de tamaño.

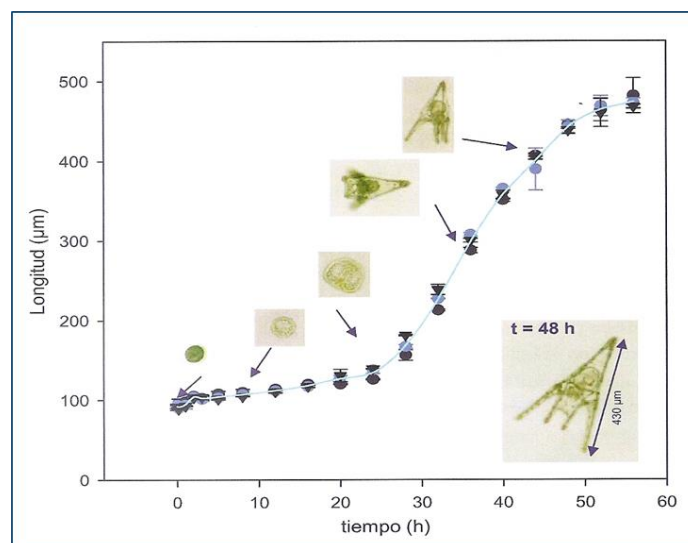


Figura 8: Evolución del crecimiento de la larva de erizo de mar con el tiempo de incubación.



Figura 9: (a) Erizo macho (b) erizo hembra (c) probeta conteniendo los óvulos fecundados.

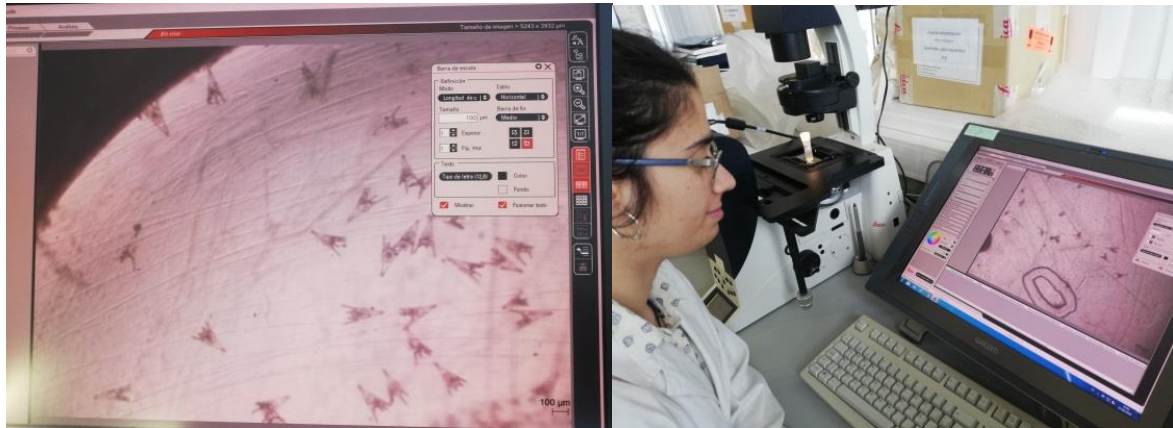


Figura 10: Medida de la longitud de las larvas en un microscopio invertido.

Los valores de longitud de las larvas se introducen en una hoja de cálculo (Excel) y se calcula la proporción neta de respuesta (PNR) para evaluar el grado de toxicidad de las muestras tal y como se muestra en la **Figura 11**.

$$\text{PNR} = \frac{\text{Crecimiento en el elutriado sin diluir}}{\text{Crecimiento en el control de agua de mar}} = \frac{\begin{matrix} \text{Longitud elutriado} \\ \text{sin diluir} \end{matrix} - \begin{matrix} \text{Longitud huevos} \end{matrix}}{\begin{matrix} \text{Longitud control} \\ \text{Agua de Mar} \end{matrix} - \begin{matrix} \text{Longitud huevos} \end{matrix}}$$

Figura 11: Calculo de la proporción neta de respuesta en el bioensayo de embriogénesis de erizo de mar.

Para realizar este estudio es necesario preparar distintas diluciones con el elutriado previamente obtenido. Para ello, se emplean viales de vidrio de 6 mL en los que se depositan distintas

proporciones de elutriado, desde el 100 %, al 33,33%, el 10%, el 3,3%, y el 1% para las cenizas, y el 100%, 33,33%, 10% y 3,33% para el sedimento. Además, también se preparan réplicas con el 100% de AMF para realizar los controles de huevos iniciales y del crecimiento de las larvas transcurridas las 48 h.

Para la obtención de los gametos es necesario contar con una hembra y un macho de erizo de mar maduros, los cuales serán utilizados para la recolección de huevos y esperma respectivamente. Para comprobar el buen estado de los gametos, con ayuda de un microscopio se verifica que los huevos presentan una forma redondeada y el esperma es móvil. Una vez realizada dicha comprobación, se procede a la fecundación in vitro, la cual consiste en la deposición de los huevos en una probeta de vidrio que contiene 50 mL de AMF hasta que esta se torne a un color anaranjado, y la posterior adición de una pequeña cantidad de esperma, con el cual se fecundan los huevos. Para favorecer el proceso de fecundación se agita cuidadosamente la muestra con ayuda de un émbolo.

Tras esto, se toman 3 alícuotas de 20 μ L y se realiza un recuento del número de huevos totales y el número total de huevos fecundados, lo cual nos indica el porcentaje de fecundación de los huevos, si este valor supera el 90%, se procede al cálculo de la densidad de huevos en la probeta, y se reparte en los viales un volumen que asegure la presencia de 40 individuos por mL. Las muestras que se corresponden al control inicial se fijan añadiendo unas gotas de formol al 40%, mientras que el resto de muestras son tapadas tras la fecundación e incubadas a 20 °C durante 48 h. Transcurrido este período, las muestras son fijadas con unas gotas de formol al 40%.

Se miden los 35 primeros individuos que se encuentren visualizados en el microscopio. Para las mediciones en el microscopio invertido se emplea el software de análisis de imagen LAS (Leica Application Suite). Una vez obtenidos todos los datos, se procede al cálculo de los resultados del bioensayo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1. Parámetros físico-químicos de los elutriados.

En el estudio realizado anteriormente con cenizas procedentes de la quema de ramas de árboles obtenidas tras la poda realizada en los jardines de la Isla de Toralla, se observaba que el valor de pH del agua de mar aumentaba considerablemente tras realizar el proceso de elutriado, y las concentraciones de amonio y amoníaco eran muy elevadas.

Los resultados obtenidos para los parámetros físico-químicos de los elutriados realizados con agua de mar se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4: Resultados de los parámetros físico-químicos analizados en los elutriados con agua de mar.

Muestra	O ₂ (mg L ⁻¹)	pH	Salinidad (‰)	S ²⁻ (mg L ⁻¹)	NH ₃ (μg L ⁻¹)	NH ₄ ⁺ (mg L ⁻¹)
FSW	7,80	8,07	34,7	<0,02	<10	<0,10
Matamá	8,25	7,80	34,9	<0,02	78,61	5,05
Baiña	8,17	7,78	35,1	<0,02	250,56	17,35
STC 1 3/11	8,27	7,62	41,2	<0,02	16,13	1,50
STC 2 3/11	8,36	7,77	39,4	<0,02	18,85	1,16
STC 3 3/11	8,59	7,80	39,6	<0,02	14,68	0,83
STC 4 3/11	8,55	7,79	38,9	<0,02	15,06	0,82
STC 5 3/11	8,56	8,07	36,5	<0,02	<10	0,18

Se observa que en los elutriados de agua de mar obtenidos con las muestras de cenizas de Baiña y Matamá, las concentraciones de amoníaco superan el máximo recomendado para realizar bioensayos de embriogénesis de *P. lividus* (0,040 mg L⁻¹), así como elevadas concentraciones de ión amonio. *Esto* podría deberse a que tras un incendio forestal la concentración de este compuesto puede llegar a aumentar entre 5 y 60 veces su valor (Spencer *et al*, 2003). Estos compuestos, junto con otros derivados del nitrógeno, contribuyen a la nitrificación de los suelos, sobre todo donde se han producido quemados de madera de forma natural o intencionada (Covington y Sackett, 1992), por ello las concentraciones de este compuesto en las muestras de cenizas puede ser considerablemente más elevadas que en el sedimento.

Por otra parte, los resultados para pH, oxígeno disuelto, salinidad y sulfuros se encuentran por debajo de los valores máximos en todas las muestras.

3.2. Alcalinidad.

En el estudio anterior, se observaba que el elutriado realizado con cenizas procedentes de la quema de ramas de árboles, presentaba unas concentraciones elevadas de iones carbonato y bicarbonato, lo cual concuerda con estudios previos (Demeyer *et al.* 2001, Etitgni y Campbell, 1991). En la curva de valoración con HCl 0,1 M se observaban dos puntos de equivalencia correspondientes a la presencia de ambos iones. Sin embargo, en la **Figura 12a** se muestra la curva de valoración ácido base donde se representa la variación del pH con el volumen de HCl 0,1 M añadido al elutriado de agua ultrapura obtenido con la muestra de Baiña. En esta se observa un único punto de equivalencia correspondiente a la presencia de ion bicarbonato en la muestra, y ausencia de ion carbonato. La **Figura 12b** muestra la derivada de la curva de valoración, donde el valor máximo determinan el volumen de HCl donde se ha alcanzado el punto de equivalencia correspondientes a la concentración de bicarbonato.

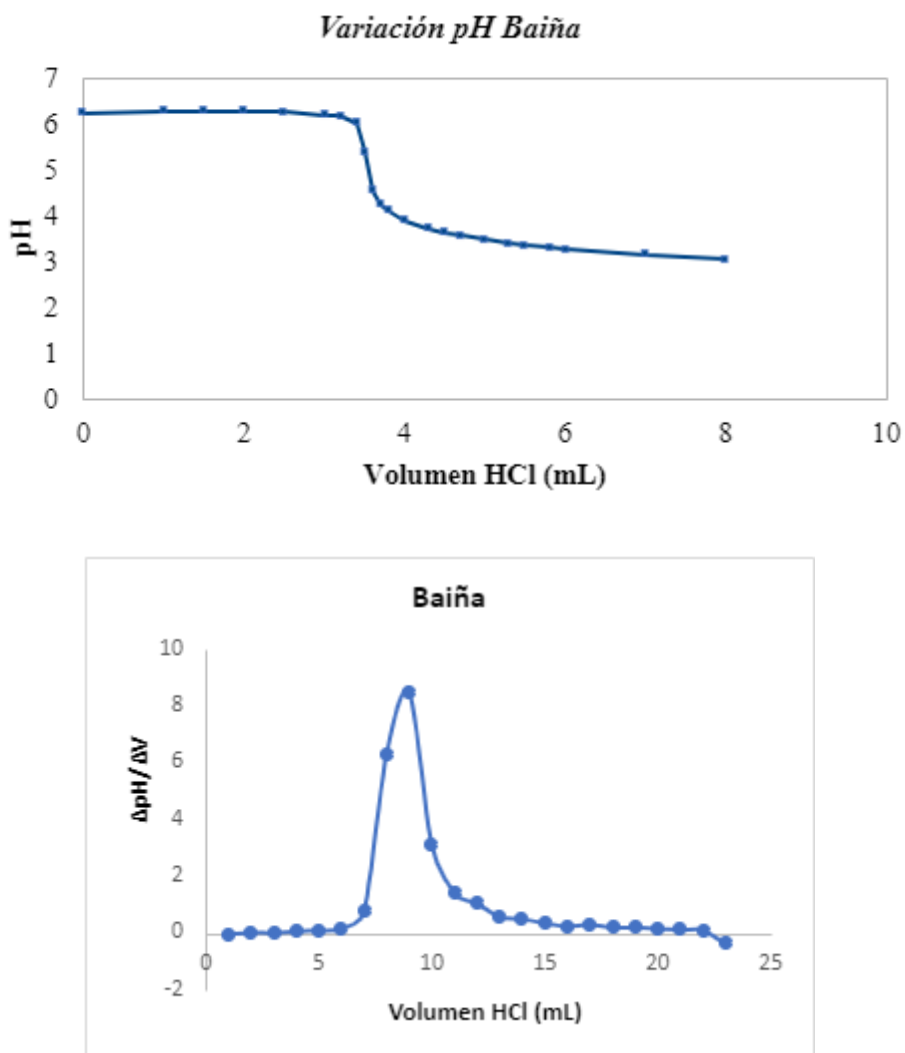


Figura 12: (a) Variación del pH con el volumen de HCl añadido en el elutriado de agua dulce de la muestra de Baiña (b) Derivada de la curva de valoración anterior.

Los valores de las concentraciones del ión bicarbonato (HCO_3^-) encontrados se muestran en la **Tabla 5**. Los valores de pH de las muestras estudiadas oscilan entre 7,62 y 8,07, por lo que no hay diferencias significativas entre estaciones.

Tabla 5: Concentración de ión bicarbonato (HCO_3^-) en mol Kg^{-1} determinada en los elutriados de agua dulce.

Muestra	$[\text{HCO}_3^-]$ mol/Kg
Baiña	37,00
Matamá	28,75

Como se puede observar, los valores de las cenizas recolectadas tras los incendios de Baiña y Matamá difieren considerablemente de los obtenidos de las cenizas de la hoguera provocada en Toralla, destacando principalmente la carencia de ión carbonato en las dos primeras, lo cual explicaría que el pH del elutriado con agua ultrapura sea más bajo.

3.3. Concentraciones de Ca^{2+} .

Como se mencionó anteriormente, el calcio es uno de los elementos que más varía en el medio tras un incendio forestal, es por ello que se analiza la concentración de este en las muestras de cenizas con las que se trabajó. Se observa que la muestra con mayor concentración de este compuesto coincide con las que presenta mayor alcalinidad, es decir, Baiña. Estos valores son similares a los de las concentraciones Ca^{2+} determinadas en las muestras de la quemar de ramas de árboles del estudio anterior.

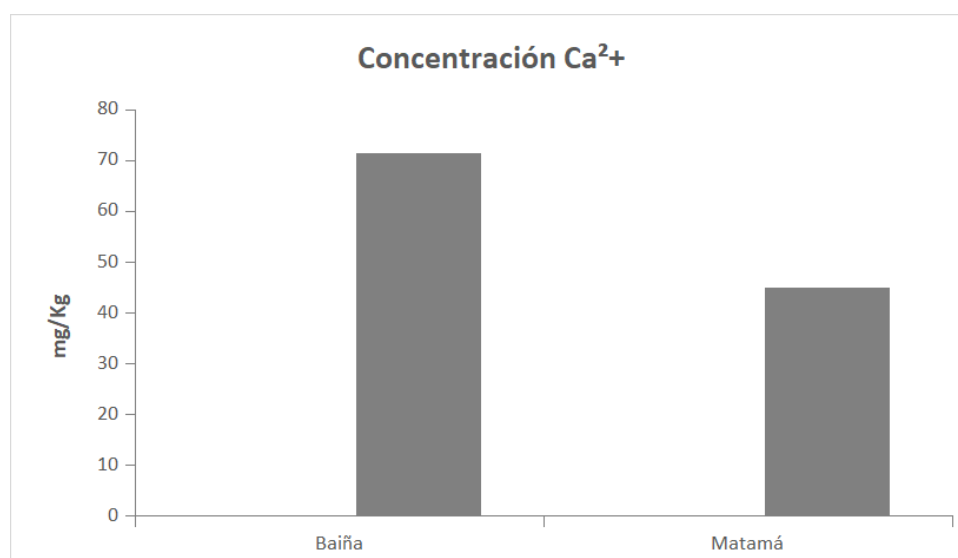


Figura 13: Concentración de Ca^{2+} en mg Kg^{-1} medidas en los elutriados de agua dulce.

3.4. Porcentaje de materia orgánica en los sedimentos marinos.

La fracción de materia orgánica presente en cada zona se muestra en la **Tabla 6**.

Tabla 6: Porcentaje de materia orgánica presente en cada estación.

Muestra	% Materia orgánica
STN 1 3/11	18,06
STN 2 3/11	15,76
STN 3 3/11	15,78
STN 4 3/11	13,09
STN 5 3/11	0,88

Con estos resultados se muestra que se produce un gradiente de mayor a menor concentración de materia orgánica desde el interior hacia el exterior de la Ría de Vigo.

3.5. Concentración de PAHs.

La **Figura 14** muestra las concentraciones de PAHs obtenidas para cada una de las estaciones según el número de anillos aromáticos. Esta representación nos permite observar la concentración total de hidrocarburos en cada una de las muestras y hacer una estima sencilla del perfil de dichos hidrocarburos en cada muestra. Como se muestra en la **Figura 14**, las concentraciones más altas de hidrocarburos se obtienen en la estación 2 y en Baíña con valores de 5486,7 y 3235,1 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, respectivamente. Las muestras de Matamá y estaciones 1 y 3 muestran concentraciones superiores a los 2000,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$, y las muestras de las estaciones 4 y 5 muestran concentraciones algo superiores a los 1000,0 $\mu\text{g Kg}^{-1}$. Por otra parte, las estaciones marítimas más afectadas se corresponden con las más internas de la ría, lo cual se explica por encontrarse en una zona estuarina fluvial (STC 1), y por las actividades antrópicas de gran impacto ambiental que se dan en las proximidades (STC 2 y STC 3). No se observa una correlación clara entre las concentraciones totales de hidrocarburos y el porcentaje de materia orgánica en el sedimento, aunque se asume que un contenido mayor de materia orgánica favorece la retención de los contaminantes. En todo caso, este contenido en materia orgánica podría explicar las diferencias de concentración en las estaciones 3, 4 y 5.

Asimismo, las muestras de Baíña y Matamá muestran unos perfiles similares donde la abundancia según el número de anillos aromáticos se presenta en el siguiente orden: 2 anillos > 3 anillos > 4 anillos > 5 y 6 anillos. Este perfil es similar en la estación 5, aunque la proporción en las concentraciones de hidrocarburos de 5 y 6 anillos es mucho menor que las muestras de Baíña y Matamá. El resto de las estaciones presentan una distribución por anillos diferente, lo cual indica que el origen de estos PAH no procede de incendios forestales. Conviene destacar la abundancia de hidrocarburos de 5 y 6 anillos en las muestras de las estaciones 1 y 2 de la Ría de Vigo.

En las **Figuras 15 y 16** se representan los porcentajes de cada PAH analizado en las muestras. Los perfiles que se muestran permiten realizar una caracterización de más precisa de los hidrocarburos presentes en cada zona. En el estudio realizado anteriormente se encontraba que los hidrocarburos más abundantes eran el naftaleno, fenantreno, benzo[a]antraceno y criseno.

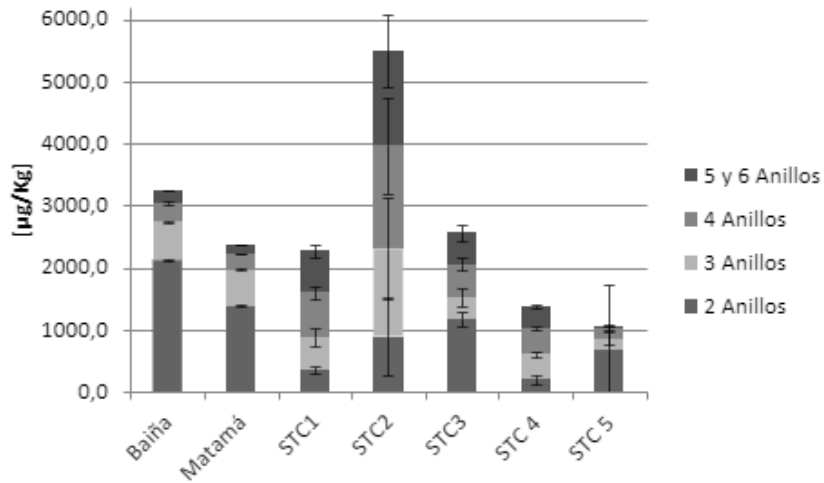


Figura 14: Concentración de PAHs de alto peso molecular (HMW PAH) y bajo peso molecular (LMW PAH) en µg Kg⁻¹.

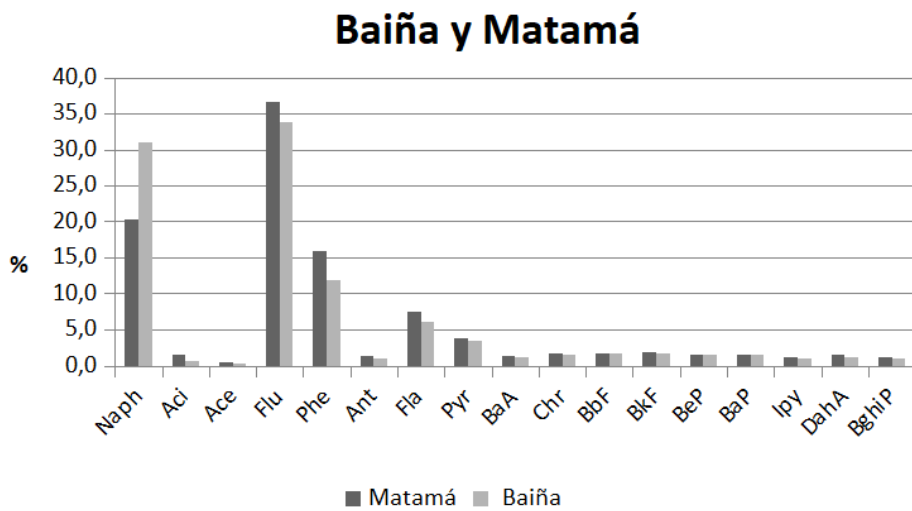


Figura 15: Porcentaje de cada tipo de PAH analizado por muestra de ceniza.

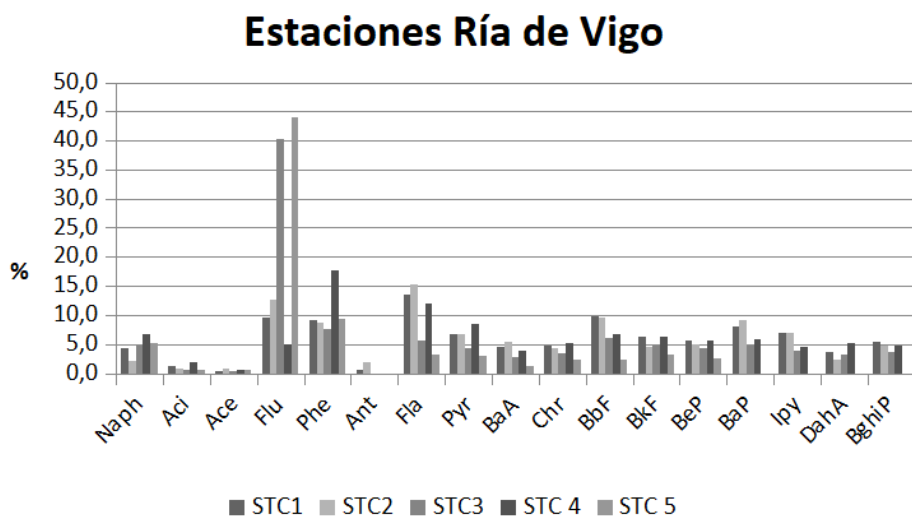


Figura 16: Porcentaje de cada tipo de PAH analizado por muestra de sedimento.

Como se puede comprobar en la Figura 15, tanto Baiña como Matamá cuentan con perfiles similares, destacando la presencia de naftaleno, fluoreno y fenantreno, y en menor medida fluoranteno y pireno, sobre el resto de compuestos. Estos resultados que coinciden con estudios donde se analizó la presencia de PAHs en cenizas y se determinó que el naftaleno y el fenantreno eran los hidrocarburos más abundantes (González *et al.* 1989; Olatunbosun *et al.* 2009; Mastro *et al.* 2015). Las diferencias de los perfiles de hidrocarburos de estas muestras con respecto a las del estudio anterior se atribuyen, fundamentalmente, a la diferente temperatura a la que se ha producido la combustión de la madera (Kim *et al.* 2003). Sin embargo, la muestra de la estación 5, cuya distribución de hidrocarburos por número de anillos aromáticos parecía ser similar a la de Baiña y Matamá, presenta un perfil de hidrocarburos muy diferente, solamente se asemeja en la abundancia de fluoreno. Esto confirma que el origen de estos hidrocarburos tampoco proviene de incendios forestales. Se ha demostrado que agentes atmosféricos como la temperatura, humedad y precipitaciones, pueden favorecer la degradación de estos compuestos y su eliminación del medio, por lo que dependiendo de la climatología de la zona y la época del año en la que suceda el incendio, la toxicidad potencial y los efectos ecológicos de los PAHs pueden variar considerablemente (Olivella *et al.* 2006; Vila *et al.* 2007).

Es de destacar que el único hidrocarburo que se encuentra en una alta concentración en todas las muestras analizadas es el fluoreno, ya que su presencia no debería ser superior a los 19 mg Kg⁻¹ (valor ERL, del inglés *effect range low*, Long *et al.* 1995), y este valor se ve superado hasta en un 50% en Baiña y la estación 3. Este hidrocarburo, junto con el dibenzo[a,h]antraceno superan los valores de referencia en todas las muestras de sedimento marino excepto la estación 5. El caso más llamativo es el de la estación 2, donde 9 PAHs superan los niveles de efecto bajo, o ERL, lo cual indica que los organismos marinos pueden llegar a sufrir efectos tóxicos por estos contaminantes.

Estudios previos determinaron que la Ría de Vigo presentaba contaminación por PAHs con un gradiente de mayor concentración en la zona interna y media, y con una baja presencia de estos compuestos en la parte externa de la Ría (Mónaco *et al.* 2017, Pérez *et al.* 2020). Estas concentraciones tan elevadas se encontraron, sobre todo, en las zonas portuarias y cercanas a astilleros, así como en la Enseñada de San Simón, lo cual coincide con los resultados obtenidos en este estudio, donde las estaciones 2, 3 y 1 presentan la mayor concentración de PAHs respectivamente. Además, el trabajo de Viñas *et al.* (2009) también indica una similitud en los perfiles de PAHs analizados, ya que se encuentran mayores concentraciones de LMW PAHs y HMW PAHs (hidrocarburos de bajo y alto peso molecular, respectivamente, de sus siglas en inglés), que en este estudio sería equivalente a las concentraciones de hidrocarburos de 2 y 3 anillos (LMW) y de 4, 5 y 6 anillos (HMW).

3.5. Bioensayos de toxicidad.

Los resultados para el incremento en el tamaño con respecto al control de las larvas de *P. lividus* se representan en la **Figura 17**. Los valores mostrados en el eje de abscisas indican la dilución, siendo 1 sin diluir y 100 diluida 100 veces.

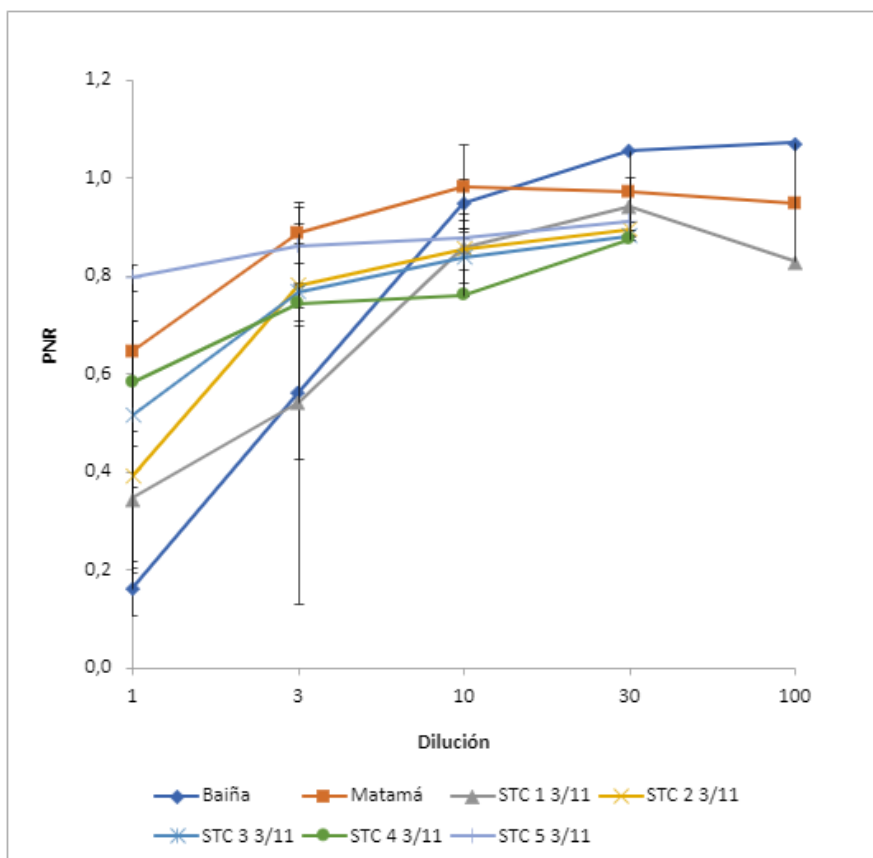


Figura 17: Proporción de respuesta neta en el ensayo de toxicidad con erizo de mar obtenidas en los elutriados de las muestras de cenizas (Dilución = 1) y sus correspondientes diluciones.

Según Durán y Beiras (2010), para determinar si estas muestras presentan toxicidad, hay que tener en cuenta los valores obtenidos, y compararlos con los que se muestran en la **Tabla 7**. En este trabajo se mostraba la buena relación existente entre los valores de toxicidad establecidos en el trabajo de Long *et al.* 1995, en el que estimaron los valores ERL – ERM (del inglés, *effect range medium*) con los criterios de toxicidad establecidos en esta tabla.

Tabla 7: Criterios de valoración del grado de toxicidad del elutriado para PNR y UT.

Toxicidad	UT	PNR
Ausencia	< 0,27	> 0.694
Indicios	0,27 - 0,86	0.694-0.508
Relevante	> 0,86	<0.508

A partir de este gráfico y los indicadores mostrados en la tabla, se determina que las muestras que no presentan toxicidad son las de Matamá y la estación 5. Las estaciones 1, 3 y 4 muestran indicios de toxicidad, y las muestras de Baíña y la estación 2 muestran una toxicidad relevante. Estos valores de toxicidad encontrados concuerdan con las concentraciones de PAH encontradas. La baja toxicidad de la estación 5 está asociada a una baja concentración de PAHs. En el caso de Matamá, a pesar de

tener concentraciones totales de PAH similares a las estaciones 1 y 3, presenta una baja proporción de hidrocarburos de 4, 5 y 6 anillos, lo que explica que el valor de PNR sea menor que el de la estación 5, pero mayor que el de las estaciones 1 y 3. En el caso de la mayor toxicidad en Baíña con respecto a la de la estación 2, con una concentración total de PAHs y una proporción de hidrocarburos de 4, 5 y 6 anillos menores, se debe atribuir a la alta concentración de amonio y amoníaco que se muestran en la tabla 4.

Al realizar el bioensayo con el elutriado diluido 1:3 con agua de mar filtrada, solamente las estaciones de Baíña y la estación 1 muestran indicios de toxicidad, mientras que el resto alcanzan valores considerados no tóxicos. A partir de la dilución 1:10 y siguientes, todas las muestras presentan valores de PNR considerados como no tóxicos.

Además de analizar los valores de PNR, también se realizó el cálculo de las unidades tóxicas de cada muestra (UT), valor que se obtiene realizando la representación de los valores de PNR frente al logaritmo de la dilución realizada en cada una de las muestras y sus correspondientes diluciones. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 18**.

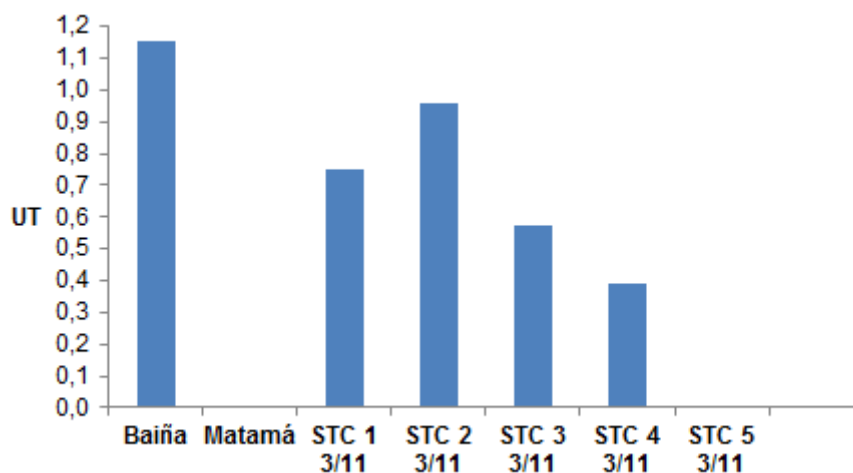


Figura 18: Unidades de toxicidad obtenidas para los elutriados de las muestras de cenizas.

En dicha Figura se confirman los resultados obtenidos con los valores de PNR, en los que tanto Baíña como la estación 2 presentan una toxicidad relevante, ya que las larvas se desarrollan poco, y solamente lo hacen se encuentran cuando el elutriado se ha diluido como mínimo 10 veces. Las estaciones 1, 3 y 4 muestran indicios de toxicidad, lo cual explicaría la mala respuesta inicial y su rápida mejoría en la primera de las diluciones, mientras que los elutriados preparados con las muestras de Matamá y la estación 5 no presentan ningún riesgo para los organismos.

Los valores encontrados en este estudio son acordes con los encontrados en trabajos realizados anteriormente (Saco-Álvarez et al. 2010, Beiras et al. 2003a y b, Durán y Beiras 2010), en los que se evaluaba la toxicidad de los elutriados de sedimentos de la Ría de Vigo, y en los que la mayor toxicidad se encuentra en los sedimentos recogidos en áreas cercanas al puerto de Vigo y otras áreas urbanas.

4. CONCLUSIONES.

- Las cenizas procedentes de los puntos de muestreo de Matamá (Vigo) y Baíña (Baiona), que se vieron afectados por los incendios forestales que ocurrieron en la noche del 15 de octubre de 2017 presentan las siguientes características:

- Las concentraciones de los iones carbonato son más bajas que las encontradas en las muestras de cenizas procedentes de la quema de la madera en una hoguera, debido a que la combustión de la madera en el incendio forestal no ha sido tan completa.
- Las cenizas procedentes de la estación de Baíña (Baiona) presentan concentraciones altas de ion amonio y amoníaco, mientras que las de la estación de Matamá (Vigo) presentan concentraciones más bajas.
- Las concentraciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) son más altas en la estación de Matamá (Vigo) que en la de Baíña (Baiona). Además, los perfiles de concentración de ambas muestras son muy similares entre sí y comparables a los que se han encontrado en otros estudios, donde los hidrocarburos predominantes son el naftaleno y el fluoreno y se caracterizan por una mayor abundancia de hidrocarburos más ligeros.

- Los sedimentos recogidos a lo largo de un transecto longitudinal en la Ría de Vigo, en días posteriores al incendio (3 de noviembre de 2017), presentan las siguientes características:

- El porcentaje de materia orgánica encontrada en los sedimentos varía entre el 13 y el 18%, excepto en la estación 5, que se caracteriza por ser un sedimento formado por arenas y conchas de organismos marinos, y apenas se observan sedimentos de fracción fina.
- Las concentraciones de ion amonio y amoníaco en los sedimentos son muy bajas.
 - Las concentraciones de PAHs aumentan conforme las estaciones están situadas más hacia el interior de la Ría. La máxima concentración se encuentra en el punto STC 2 que está situado próximo a unos astilleros y a un puerto deportivo.
 - Los perfiles de PAHs de las muestras de sedimentos difieren de los encontrados en las muestras de cenizas, lo que se atribuye a que su origen procede de otra fuente de contaminación distinta a los incendios forestales.

- En los bioensayos de toxicidad realizados con larvas de erizo de mar (*P. lividus*), se observa que las muestras que presentan toxicidad son las cenizas de la estación de Baíña (Baiona) y los sedimentos de las estaciones STC 1 y 2. Esta toxicidad es atribuible a las siguientes causas:

- La toxicidad de las cenizas de la estación de Baíña (Baiona), a pesar de tener un contenido de PAHs menor a la muestra de Matamá (Vigo), es atribuible a su alto contenido de amonio y amoníaco.
- La toxicidad de los sedimentos de las estaciones STC 1 y 2 sí es atribuible al alto contenido de PAHs. Además, se observa que en los perfiles de hidrocarburos de estas estaciones hay mayor una abundancia de los hidrocarburos más pesados.

- Es necesario diluir el elutriado hasta 10 veces para encontrar que el bioensayo con larvas de erizo no presenta toxicidad en las muestras de Baíña y STC 2.

- Estas conclusiones confirman la consideración final mencionada en el informe anterior, en la que se planteaba la posibilidad de que los PAHs y las otras sustancias que puedan causar toxicidad en el bioensayo con larvas de erizo de mar (*P. lividus*), procedentes de las cenizas de la madera quemada tras un incendio forestal, tuvieran pocas probabilidades de llegar hasta el medio marino. Esto es debido a que los hidrocarburos y el amonio procedentes de las cenizas sufren una serie de transformaciones, por los efectos de filtrado y lixiviado que pueden tener lugar en las aguas fluviales y el medio terrestre, así como por el efecto de filtro que se produciría en los estuarios cuando los residuos transportados por el agua dulce se mezclan con el agua de mar.

5. BIBLIOGRAFÍA.

- Aronsson, K. A., y Ekelund, N. G. (2004). Biological Effects of Wood Ash Application to Forest and Aquatic Ecosystems. *Environmental Quality*, 33, 1595–1605.
- Beiras R, Bellas J, Fernández N, Lorenzo JI, Cobelo-García A. 2003a. Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryo-larval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. *Mar Environ Res* 59: 531–553.
- Beiras R, Fernández N, Bellas J, Besada V, González-Quijano A, Nunes T. 2003b. Integrative assessment of marine pollution in Galician estuaries using sediment chemistry, mussel bioaccumulation, and embryo–larval toxicity bioassays. *Chemosphere* 52:1209–1224.
- Beiras, R., y Pérez, S. (Eds.). (2013). *Manual de métodos básicos en Contaminación Acuática*. Vigo, Pontevedra, España: Estación de Ciencias Mariñas de Toralla (ECIMAT).
- Bellas, J., Nieto Ó, & Beiras, R. (2011). Integrative Assessment of Coastal Pollution: Development and Evaluation of Sediment Quality Criteria from Chemical Contamination and Ecotoxicological Data. *Continental Shelf Research* 31(5): 448–56.
- Bundt, M., Krauss, M., Blase, P., and Wilcke, W. (2011). Forest Fertilization with Wood Ash: Effect on the Distribution and Storage of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and Polychlorinated Biphenyls (PCBs). *Environmental Quality*, 30(4), 1296–1304.
- Cancelo-González J., Rial-Rivas M. E., Díaz-Fierros F. (2013) Effects of fire on cation content in water: a laboratory simulation study. *International Journal of Wildland Fire* 22, 667-680.
<https://doi.org/10.1071/WF12178>
- Cancelo-González, J. J., & Viqueira, F. D. F. (2018). Incendios forestales y salud pública. En *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* (Vol. 84, No. 3).
- CEN, European Committee for Standardization. 2002. Characterization of waste–Leaching–Compliance test for leaching of granular waste materials and sludges. Part 2: One stage batch test at a liquid to solid ratio of 10 L/kg for materials with particle size below 4 mm (without or with size reduction). EN 12457-2:2002. Brussels, Belgium.
- Chen, C. W., & Chen, C. F. (2011). Distribution, origin, and potential toxicological significance of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sediments of Kaohsiung Harbor, Taiwan. *Marine Pollution Bulletin*, 63(5–12), 417–423. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2011.04.047>
- Covington, W. W., y Sackett, S. S. (1992). Soil mineral nitrogen changes following prescribed burning in ponderosa pine. *Forest Ecology and Management*, 54, 175-191.
- Delgado Arango, N., & Vicente Mariño, M. (2019). La cobertura periodística de los incendios forestales en la prensa digital de España: el caso de Galicia 2017 = The journalistic coverage of the wildfires in the Spanish digital press: the case of Galicia 2017. *REVISTA ESPAÑOLA DE COMUNICACIÓN EN SALUD*.
<https://doi.org/10.20318/recs.2019.4439>
- Demeyer, A., Voundi Nkana, J. C., & Verloo, M. G. (2001). Characteristics of wood ash and influence on soil properties and nutrient uptake: an overview. *Bioresource Technology* (77), 287-295.
- Douben, Peter ET (ed.). *PAHs: an ecotoxicological perspective*. John Wiley & Sons, 2003.
- Durán, I., y Beiras, R. (2010). Assessment criteria for the sea-urchin embryo bioassay. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(5), 1192-1198.
- Eitgni, L., y Campbell, A. G. (1991). Physical and Chemical Characteristics of Wood Ash. *Bioresource Technology*, 37, 173-178.

- González-Vila, F. J., Río Andrade, J. C. del, Martín Martínez, F., & López Ruiz, J. (1989). Los incendios forestales como fuente de hidrocarburos policíclicos aromáticos. <http://hdl.handle.net/10261/59470>
- I. White, A. Wade, M. Worthy, N. Mueller, T. Daniell, R. Wasson The vulnerability of water supply catchments to bushfires: impacts of the January 2003 wildfires on the Australian Capital Territory Australian Journal of Water Resources, 10 (2) (2006), pp. 1-16.
- Kim, E. J., Oh, J. E., & Chang, Y. S. (2003). Effects of forest fire on the level and distribution of PCDD/Fs and PAHs in soil. Science of The Total Environment, 311(1–3), 177–189. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(03\)00095-0](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(03)00095-0)
- Long, E. R., Macdonald, D. D., Smith, S. L., y Calder, F. d. (1995). Incidence of Adverse Biological Effects Within Ranges of Chemical Concentrations in Marine and Estuarine Sediments. Environmental Management, 19(1), 81-97.
- Mahendra, K. M., Kenneth, W. R., y Andrew, J. B. (1993). Wood ash composition as a function of function of furnace temperature. Biomass and Bioenergy, 4(2), 103-116.
- Masto, R. E., Sarkar, E., George, J., Jyoti, K., Dutta, P., & Ram, L. C. (2015). PAHs and potentially toxic elements in the fly ash and bed ash of biomass fired power plants. Fuel Processing Technology, 132, 139–152.
- Monaco, D., Chianese, E., Riccio, A., Delgado-Sanchez, A., & Lacorte, S. (2017). Spatial distribution of heavy hydrocarbons, PAHs and metals in polluted areas. The case of “Galicia”, Spain. Marine Pollution Bulletin, 121(1–2), 230–237. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2017.06.003>
- Neary, D. G., Landsberg, J. D., Tiedemann, A. R., and Ffolliott, P. F. (2005). *Ecosystems: effects of fire on soils and water*. Forest Service, Department of Agriculture. Ogden, UT: General Technical Report.
- Olatunbosun S. Sojinu, Oluwadayo O. Sonibare & Eddy Y. Zeng (2011) Concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons in soils of a mangrove forest affected by forest fire, Toxicological & Environmental Chemistry, 93:3, 450-461, <https://doi.org/10.1080/02772248.2010.532130>
- Olivella, M. A., Ribalta, T. G., de Febrer, A. R., Mollet, J. M., & de Las Heras, F. X. C. (2006). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in riverine waters after Mediterranean forest fires. Science of The Total Environment, 355(1–3), 156–166. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2005.02.033>
- Pereiro, M. P., Dominguez, M. A. C., & Lozano, J. D. del C. (2018). La cobertura periódica de los incendios de Galicia y Portugal de octubre de 2017: un análisis de la información de emergencia de diarios portugueses, españoles y gallegos. Estudos Em Comunicaçã, 1(26). <https://doi.org/10.20287/ec.n26.v1.a11>
- Pérez-Fernández, B., Viñas, L. & Bargiela, J. Historical Profiles of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Marine Sediment Cores from Northwest Spain. Arch Environ Contam Toxicol 71, 439–453 (2016). <https://doi.org/10.1007/s00244-016-0312-6>
- Pérez-Fernández, B., Viñas, L., & Besada, V. (2020). Concentrations of organic and inorganic pollutants in four Iberian estuaries, North Eastern Atlantic. Study of benchmark values estimation. Marine Chemistry, 224, 103828. <https://doi.org/10.1016/J.MARCHEM.2020.103828>
- Saco-Álvarez L, Duran I, Lorenzo JI, Beiras J. 2010. Methodological basis for the standardization of a Marine Sea-urchin Embryo Test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. Ecotoxicol. Environ <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.01.018>
- Smith, H. G., Sheridan, G. J., Lane, P. N. J., Nyman, P., & Haydon, S. (2011). Wildfire effects on water quality in forest catchments: A review with implications for water supply. Journal of Hydrology, 396(1–2), 170–192. <https://doi.org/10.1016/J.JHYDROL.2010.10.043>

- Spencer, C. N., Gabel, K. O., & Hauer, F. R. (2003). Wildfire effects on stream food webs and nutrient dynamics in Glacier National Park, USA. *Forest Ecology and Management*, 178(1–2), 141–153. [https://doi.org/10.1016/S0378-1127\(03\)00058-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1127(03)00058-6)
- US Environmental Protection Agency. 1992. Toxicity Characteristic Leaching Procedure (TCLP). 40 CFR Appendix II to Part 261–Method 1311. Washington DC.
- Vila-Escalé, M., Vegas-Vilarrúbia, T., & Prat, N. (2007). Release of polycyclic aromatic compounds into a Mediterranean creek (Catalonia, NE Spain) after a forest fire. *Water Research*, 41(10), 2171–2179. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2006.07.029>
- Vila-Escalé, M., Vegas-Vilarrúbia, T., & Prat, N. (2007). Release of polycyclic aromatic compounds into a Mediterranean creek (Catalonia, NE Spain) after a forest fire. *Water Research*, 41(10), 2171–2179. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2006.07.029>
- Viñas, L., Franco, M.A. & González, J.J. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Composition of Sediments in the Ría de Vigo (NW Spain). *Arch Environ Contam Toxicol* 57, 42–49 (2009). <https://doi.org/10.1007/s00244-008-9230-6>