

Egoitza Nagusia / Sede Central

Txatxarramendi Ugarte z/g

E-48395 Sukarrieta - Bizkaia (Spain)

Tel.: +34 94 602 94 00 - Fax: +34 94 687 00 06

Parque Tecnológico de Bizkaia

Astondo Bidea - Edificio 609

E-48160 Derio - Bizkaia (Spain)

Tel.: +34 94 657 40 00 - Fax: +34 94 657 25 55

Herrera Kaia. Portualdea, z/g

E-20110 Pasaia - Gipuzkoa (Spain)

Tel.: +34 94 300 48 00 - Fax: +34 94 300 48 01

www.azti.es

info@azti.es



**Aplicación de dispositivos de muestreo pasivo
como herramientas de mejora frente a las
utilizadas tradicionalmente para la evaluación
del estado químico de las aguas de transición y
costeras**

Informe final (Años 2009-2010)
para:



ur agentzia
agencia vasca del agua

Pasaia, 15 de diciembre de 2011

Tipo documento	Informe final
Título documento	Aplicación de dispositivos de muestreo pasivo como herramientas de mejora frente a las utilizadas tradicionalmente para la evaluación del estado químico de las aguas de transición y costeras
Fecha	15/12/2011
Proyecto	Aplicación de dispositivos de muestreo pasivo como herramientas de mejora frente a las utilizadas tradicionalmente para la evaluación del estado químico de las aguas de transición y costeras
Código	IM10UraDGTs
Cliente	Ura, Agencia Vasca del Agua

Equipo de proyecto:
Dr María Jesús Belzunce Segarra
Dña Natalia Montero Ruíz
Dr Joxe Mikel Garmendia Etxandi
Dr Izaskun Zorita Aguirre
Dr Iratxe Menchaca Cortazar
Dr Joana Larreta Astola



Responsable proyecto María Jesús Belzunce Segarra

Revisado por
Fecha Javier Franco San Sebastián

Si procede, este documento deberá ser citado del siguiente modo:

Belzunce Segarra MJ, N Montero, JM Garmendia, I Zorita, I Menchaca, J Larreta. 2011. Aplicación de dispositivos de muestreo pasivo como herramientas de mejora frente a las utilizadas tradicionalmente para la evaluación del estado químico de las aguas de transición y costeras. Informe Técnico realizado por AZTI para la Agencia Vasca del Agua. 40 pp.

AGRADECIMIENTOS

La coordinación de este trabajo ha sido llevada a cabo por la Dra. María Jesús Belzunce Segarra. En el desarrollo del mismo han colaborado Dña Natalia Montero Ruíz, Dr. Joxe Mikel Garmendia, Dra Izaskun Zorita, Dra Joana Larreta, Dra Iratxe Menchaca, de la Unidad de Investigación Marina de AZTI-TECNALIA, en Pasajes.

Nuestro agradecimiento se extiende a todos aquellos que han participado en las labores de muestreo y de análisis sin los que no hubiera sido posible llevar a su término este trabajo: Carlos Erauskin, Miguel Ángel Santesteban, Ekaitz Erauskin, Iker Urtizberea, Inmaculada Martín, Joana Larreta, Irene Gómez, Maite Cuesta, Mariví Lucero, Deniz Kukul, Naiara Serrano.

Finalmente, nuestro agradecimiento se dirige a la Agencia Vasca del Agua por la confianza puesta en nosotros para llevar a cabo este estudio.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	3
1. ANTECEDENTES	6
2. OBJETIVOS	8
3. PLAN DE TRABAJO	9
4. MATERIAL Y MÉTODOS APLICADOS PARA EL DESARROLLO DE LOS OBJETIVOS 1 Y 2 (2009)	11
4.1. ÁREA DE ESTUDIO Y CAMPAÑAS DE MUESTREO EN 2009	11
4.2. DESCRIPCIÓN DE LOS MUESTREADORES PASIVOS UTILIZADOS: DIFFUSIVE GRADIENT IN THIN FILMS (DGTs)	12
4.3. CARACTERIZACIÓN DE LA COLUMNA DE AGUA: DGTs Y MEJILLONES	14
4.4. CARACTERIZACIÓN DEL SEDIMENTO	14
4.5. TÉCNICAS TIE.....	15
5. RESULTADOS (2009)	17
5.1 COLUMNA DE AGUA: DGTs Y MEJILLONES	17
5.2 SEDIMENTOS: BIOENSAYOS Y TÉCNICAS TIE	19
6. DISCUSIÓN (2009)	21
7. CONCLUSIONES (2009)	24
8. MATERIAL Y MÉTODOS APLICADOS PARA EL DESARROLLO DEL OBJETIVO 3 (2010)	25
8.1 ÁREA DE ESTUDIO Y CAMPAÑAS DE MUESTREO EN 2010	25
9. RESULTADOS (2010)	27
9.1 CONCENTRACIÓN DE METALES MEDIDA MEDIANTE DGTs	27
9.2 CALIDAD DEL AGUA DE LOS ESTUARIOS	28

10. DISCUSIÓN (2010)	30
11. CONCLUSIONES (2010)	32
12. EJERCICIO DE INTERCALIBRACIÓN (2010)	33
12.1 INTRODUCCIÓN.....	33
12.2 MATERIAL Y MÉTODOS	33
12.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
13. BIBLIOGRAFÍA	37
14. ANEXO: LOGROS CIENTÍFICOS Y DIFUSIÓN	41

1. ANTECEDENTES

Este proyecto surge por la necesidad de desarrollar nuevas tecnologías que permitan la evaluación de la calidad del agua y de la presencia de contaminantes de acuerdo con las demandas de las nuevas directivas europeas. Así, la Directiva Marco del Agua (DMA; 2000/60/EC) tiene como objetivo el alcanzar el ‘Buen Estado Ecológico’ de las masas de agua de los países europeos miembro para el 2015. El estado ecológico se refiere al estado de los elementos biológicos y al estado químico (i.e. concentración de las sustancias prioritarias). En la actualidad, la evaluación del estado químico, bajo las directrices de la DMA, se basa en la obtención de muestras de agua puntuales, filtrado y posterior determinación de los contaminantes, lo que puede conllevar la contaminación de las muestras en las diferentes etapas del proceso. En cuanto a los metales, su concentración en el medio marino y en los estuarios es muy baja y variable, por lo que en ocasiones no pueden ser medidos mediante las técnicas analíticas convencionales. Sin embargo, la mayor limitación de las muestras puntuales en los estuarios es su baja representatividad, ya que solo caracterizan las condiciones existentes en el momento exacto del muestreo, sin ser representativas de las fluctuaciones en la concentración de contaminantes en esas masas de agua.

En este sentido, los muestreadores pasivos, como los DGT (Diffusive Gradient in Thin-Films), presentan una serie de ventajas frente al muestreo convencional del agua (Davison y Zhang 1994). Los DGTs se colocan en el medio y acumulan de forma continua los metales in situ, evitando la contaminación de las muestras. Además, se obtiene una concentración media representativa de todo el tiempo de estancia en el medio y no una única medida, que podría ser una subestimación o sobrestimación de la concentración real dependiendo del momento del muestreo (Dunn et al. 2003; Schintu et al. 2008; Warnken et al. 2007). Asimismo, los metales se preconcentran en el dispositivo, lo que permite la determinación de metales traza que se encuentran en bajas concentraciones en el medio y que no podrían medirse mediante las técnicas convencionales.

Por otra parte, la DMA determina que el estado químico de las masas de agua debe establecerse basándose en la comparación de la concentración de los contaminantes con los Estándares de Calidad Ambiental (EQS), que se refieren a la fracción disuelta (i.e. filtrada) en el caso de los metales. Sin embargo, se ha sugerido que las normas de calidad deberían referirse a la fracción biodisponible, como aproximación a la fracción que potencialmente tóxica para los organismos (Garofalo et al. 2004; Meyer 2002; Sherwood et al. 2009). En este sentido, el muestreador pasivo

DGT acumula los metales lábiles, es decir los iones libres y los complejos fácilmente dissociables, que representan los contaminantes potencialmente disponibles para los organismos (Davison y Zhang 1994; Schintu et al. 2008). Por lo tanto, esta técnica podría favorecer el establecimiento de relaciones más consistentes entre los análisis químicos y la toxicidad en los organismos, proveyendo una imagen más representativa de la calidad del medio. Esto ayudaría en la interpretación del estado ecológico, que es el objetivo final de la DMA. Por todo ello, el uso de los muestreadores pasivos se está promoviendo como herramienta para monitorizar la presencia de contaminantes en programas de seguimiento ambiental, diseñados en el marco de las directivas y estrategias europeas.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es validar los dispositivos de muestreo pasivo para la evaluación de la contaminación por metales traza en el medio marino. Para ello se plantearon tres objetivos operacionales que se desarrollaron durante dos años y se enumeran a continuación:

1. Identificar un gradiente de concentración de contaminantes a lo largo del estuario del Oiartzun (2009).
2. Establecer correlaciones entre la concentración de metales determinados en los dispositivos de muestreo pasivo y la concentración de metales medidos en mejillones (2009).
3. Evaluar el interés y la viabilidad del uso de dispositivos de muestreo pasivo para la evaluación del estado químico de las aguas de transición y costeras (2010).

3. PLAN DE TRABAJO

Para el cumplimiento de los objetivos 1 y 2 se eligió como taller de estudio el estuario del Oiartzun por ser un medio altamente alterado debido a la alta actividad industrial y urbana en la zona.

Durante el año 2009 se llevaron a cabo campañas de muestreo en dos épocas del año, en primavera y a finales de verano, con el objetivo de estudiar la influencia de los parámetros medioambientales en la disponibilidad de los contaminantes. El muestreo se realizó a bordo de una lancha neumática, propiedad de AZTI-Tecnalia, equipada con el material necesario para la toma de muestras y medida de parámetros in situ.

Estudios anteriores en la zona permitieron la selección de 4 estaciones donde se refleja un gradiente de contaminación. En las estaciones seleccionadas se instalaron los muestreadores pasivos y mejillones simultáneamente. Los mejillones se transplantaron desde una zona limpia hasta las estaciones de estudio, con la finalidad de evaluar la bioacumulación por metales en los tejidos de mejillón y de validar las técnicas de muestreo pasivo. Los mejillones pasan por un proceso de depuración previo a su trasplante a los puntos de estudio.

Al cabo de aproximadamente un mes desde la instalación de los dispositivos de muestreo pasivo y de los mejillones, se retiró este material para el análisis de la concentración de metales. Se analizaron cuatro de los metales de mayor relevancia ecotoxicológica como el cobre, el cadmio, el plomo y el zinc. El análisis de metales se realizó mediante la técnica estándar de espectroscopia de absorción atómica, de llama para el Cu, Zn, Pb, y de cámara de grafito para el Cd.

Adicionalmente, aunque no estaba contemplado dentro de la propuesta inicial, con el fin de obtener una información más completa del sistema, se llevó a cabo el análisis de contaminación y toxicidad de los sedimentos en las cuatro estaciones seleccionadas. La toxicidad potencial de los sedimentos se comprobó mediante dos bioensayos agudos en el laboratorio; el bioensayo de anfípodos (*Corophium multisetosum*) en el sedimento y el bioensayo de erizos (*Paracentrotus lividus*) en el elutriado. Con el fin de identificar que contaminantes eran los responsables de la toxicidad observada en los sedimentos, se llevaron a cabo manipulaciones físicas y químicas de los sedimentos y los elutriados mediante técnicas TIE (Toxicity Identification Evaluation) que consisten en la modificación de las muestras, con el fin de reducir la biodisponibilidad de contaminantes específicos (metales, compuestos

orgánicos y amonio), para así identificar los compuestos responsables de la toxicidad y establecer relaciones de causa-efecto (USEPA 1991).

Una vez obtenidos todos los resultados se aplicaron métodos estadísticos para la integración de los datos.

El objetivo 3 se desarrolló a lo largo de 2010 y para su cumplimiento se instalaron los DGTs en una red de monitoreo en el Golfo de Bizkaia, comprendiendo estuarios de diversas características y sujetos a diversas presiones antrópicas. Se seleccionaron los 12 estuarios del País Vasco y el Adour (Suroeste de Francia). Los objetivos específicos de este trabajo han sido (i) probar la capacidad de los DGTs para funcionar adecuadamente en condiciones hidrodinámicas estables y fluctuantes, (ii) investigar la fiabilidad de las concentraciones integradas en el tiempo medidas mediante los DGTs y (iii) asesorar la eficiencia de los DGTs para discriminar entre estuarios con diferentes grados y tipos de contaminación.

Adicionalmente a las tareas propuestas en este trabajo, se participó en un ejercicio de intercalibración de muestreadores pasivos organizado por el ente francés de investigación IFREMER.

A continuación se describe la metodología aplicada y los resultados obtenidos para el desarrollo de los objetivos.

4. MATERIAL Y MÉTODOS APLICADOS PARA EL DESARROLLO DE LOS OBJETIVOS 1 Y 2 (2009)

4.1. Área de estudio y campañas de muestreo en 2009

En la Figura 1 se da la situación de las estaciones de muestreo en el estuario del Oiartzun. Se eligieron cuatro estaciones (C,P,L,H) dentro del estuario y en cada estación, tanto en mayo como en junio, se instalaron tres DGTs que se recogieron tras 10 días de estancia en el medio. Simultáneamente, se transplantaron mejillones (n=30) provenientes de una zona de referencia y que habían sido depurados en agua limpia durante 24 horas.

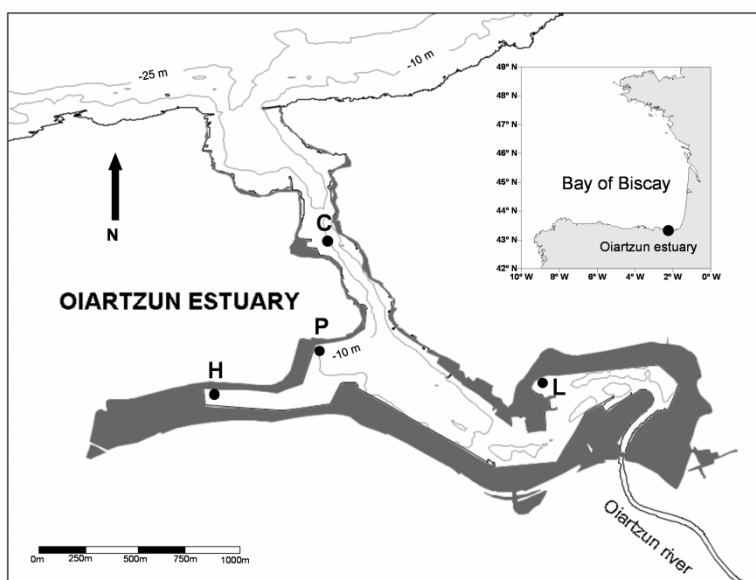


Figura 1. Localización del estuario del Oiartzun. La sombra gris representa el área de distribución del Puerto de Pasaia. Las estaciones de agua y sedimentos se han representado mediante puntos negros (C, P, L y H).

Con el fin de estudiar la cinética de acumulación en los mejillones, un grupo se retiró a los 10 días (mayo y junio) y otro al mes (mayo). La finalidad era evaluar la bioacumulación de metales en los tejidos de mejillón y de validar las técnicas de muestreo pasivo.

Además, en junio se recogieron muestras de sedimentos mediante una draga Van Veen en todas las estaciones y se preservaron a 4°C hasta su posterior análisis.

En todas las campañas de muestreo se midieron los parámetros físico-químicos más representativos; salinidad, temperatura, pH y oxígeno disuelto mediante una sonda multiparamétrica, y la turbidez mediante el disco Secchi.

4.2. Descripción de los muestreadores pasivos utilizados: Diffusive Gradient in Thin Films (DGTs)

Los DGTs son pequeños dispositivos de teflón que tienen una ventana de contacto con la solución de 2 cm de diámetro (Fig. 2A) y constan de tres membranas (Fig. 2B): la membrana exterior es un filtro de 0.45 μm que evita la abrasión de las partículas; la membrana de difusión es de poliacrilamida (0.8 mm de grosor) y su función es limitar la difusión de los metales dependiendo de su capacidad de disociación de los complejos orgánicos e inorgánicos; la membrana inferior está compuesta de poliacrilamida y en ella se encuentra inmersa la resina Chelex-100 en la que se retienen los metales.

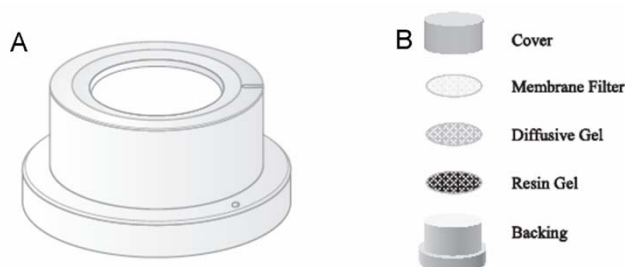


Figura 2. A) Muestreador pasivo (Diffusive Gradient in Thin-Film; DGT), B) estructura interna del DGT con sus tres membranas; filtro, membrana de difusión y resina de Chelex-100.

Una vez que el dispositivo se sumerge en el agua, los metales se difunden a través de la membrana de difusión. Los metales libres se acumularán en la resina Chelex directamente, mientras que aquellos metales asociados a complejos orgánicos e inorgánicos solo se acumularán si son capaces de disociarse del complejo durante su difusión. Es decir, solo se acumularán aquellos metales que sean fácilmente dissociables y que por tanto serían más accesibles para los organismos. Debido a la gran afinidad del Chelex-100 por los metales, se consigue una

concentración del metal cercana a cero entre la membrana de difusión y la resina Chelex, lo que favorece que los metales se acumulen constantemente en el dispositivo, aún cuando las concentraciones en el agua sean menores. Por lo tanto, el dispositivo acumula de una manera constante y permite integrar la concentración de metales a lo largo del tiempo de estancia en el medio (Fig. 3).

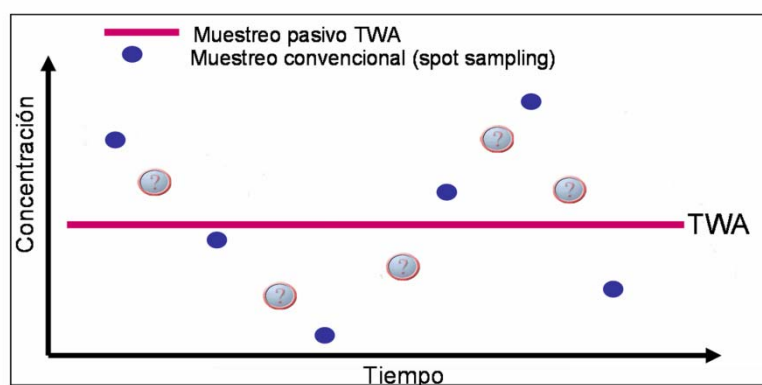


Figura 3. Diferencias del tipo de información logrado mediante el muestreo convencional (datos puntuales) y los muestreadores pasivos (TWA= promedio de concentración del tiempo de estancia en el medio).

Tras la exposición en el medio, los DGTs se retiran y se conservan a 4°C hasta su posterior análisis. Una vez en el laboratorio, se retira la membrana de Chelex y se sumerge en 1 M HNO₃ durante 24 horas para garantizar la correcta elución de los metales acumulados en la resina. Posteriormente se analiza la concentración de metales en la solución ácida mediante espectroscopía de absorción atómica (grafito y llama).

Una vez que se ha medido la concentración de metales en la solución ácida (C_e), se calcula la masa de metal acumulada (M) en la resina Chelex-100 (Eq. 1). Posteriormente, mediante una sencilla ecuación (Eq. 2), se puede calcular la concentración de metal lábil (C_b) en la columna de agua durante el tiempo de estancia en el medio.

$$(1) M = C_e (V_g + V_{HNO_3}) / f_e$$

Donde C_e es la concentración de metal medido en el ácido nítrico, V_g y V_{HNO_3} son el volumen del gel y del ácido nítrico respectivamente y f_e es el factor de elución (el ratio de metal que es extraído de la resina).

$$(2) C_b = (M\Delta g/DtA)$$

Donde M es la masa de metal acumulada en la resina, Δg es el grosor de la membrana de difusión, D es el coeficiente de difusión del metal, t el tiempo de estancia en el medio del dispositivo DGT y A es el área de exposición del dispositivo.

4.3. Caracterización de la columna de agua: DGTs y mejillones

Tras la recogida de los DGTs se analizó la concentración de Cd, Cu, Zn y Pb retenida en la resina según se ha descrito anteriormente.

En los mejillones cogidos en zona limpia y depurados se midió la concentración de metales en el tejido blando de 20 individuos para determinar sus valores de fondo. Para el transplante, los mejillones (n=30) se colocaron en mallas que se sumergieron en las estaciones a la vez que los dispositivos DGTs y se recogieron conjuntamente tras 10 días en el medio. Además en mayo, un grupo de mejillones se mantuvo durante un mes en el medio (Mayo t30). Tras ser recogidos, los mejillones se depuraron en agua marina limpia durante 24h. Posteriormente, se diseccionó el tejido blando de 10 organismos, para el cálculo del índice de condición (IC). Los restantes 20 organismos se congelaron tras su depuración. La concentración de metales se determinó mediante espectroscopía de absorción atómica (grafito y llama). La precisión y recuperación de la extracción y el procedimiento analítico se chequeó mediante material estándar de referencia de mejillón (ERM; European Reference Materials).

En el caso de los DGTs, se llevaron a cabo análisis de varianza (ANOVA; posthoc Bonferroni) para identificar diferencias significativas entre las estaciones. También, se realizaron correlaciones de Pearson para identificar posibles relaciones en la acumulación de los diferentes metales y para estudiar posibles relaciones entre DGTs y mejillones. El nivel de significancia se estableció en $\alpha=0.05$.

4.4. Caracterización del sedimento

En junio se recogieron muestras superficiales de sedimento mediante una draga Van Been en las cuatro estaciones. El sedimento se homogenizó y se tomaron submuestras para la determinación de la granulometría (Holme y McIntyre 1971; Blott y Pye 2001), el contenido de materia orgánica (Kristensen y Andersen 1987), la concentración de metales y compuestos orgánicos (Rodríguez et al. 2006) y para los bioensayos.

La toxicidad potencial de los sedimentos se comprobó mediante dos bioensayos agudos en el laboratorio; el bioensayo de anfípodos (*Corophium multisetosum*) en sedimento y el bioensayo de erizos (*Paracentrotus lividus*) en el elutriado.

Los anfípodos fueron recolectados en el campo y aclimatados durante 12 días antes del comienzo del bioensayo. Siguiendo el protocolo de Environment Canada (1992) y Casado-Martínez *et al.* (2006a), los vasos de precipitado se llenaron con el sedimento tamizado y agua marina filtrada (32 psu). Tras airearlos, se añadieron 20 anfípodos a cada vaso y se llevó a cabo el bioensayo durante 10 días, bajo condiciones controladas de laboratorio (OSPAR 2005; Schipper *et al.* 1999). Tras 10 días se tamizaron los sedimentos y se calculó el porcentaje de mortalidad de los anfípodos.

El bioensayo de erizos se llevó a cabo siguiendo la metodología de Beiras (2002) y Casado-Martínez *et al.* (2006b). Los elutriados se obtuvieron tras 30 minutos de rotación (60 rpm) de la mezcla de 100 g de sedimento y 500 mL de agua marina filtrada (0.22 μm ; 35 psu). Las duquesas se mantuvieron 12 horas a 20° C para permitir que el sedimento se depositase y se extrajo el agua sobrenadante (i.e. el elutriado). Se añadieron los huevos fecundados de erizos y se mantuvieron 48 h a 20° C en oscuridad, tras lo que se fijaron con formol (40%). En un microscopio invertido se contaron el número de larvas bien desarrolladas, para calcular el porcentaje de éxito embrionario.

Para determinar si existían diferencias significativas entre la muestra problema y el control, se realizó un análisis de varianza (ANOVA; posthoc Bonferroni), previa transformación angular arc sin (\sqrt{p}) de los datos. El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$. En los dos bioensayos, se consideró que las muestras eran tóxicas cuando se cumplían dos reglas; (a) que hubiese una diferencia significativa entre el control y la muestra que se está testando y (b) que esa diferencia fuese mayor del 20% (Casado-Martínez *et al.* 2006a,b; Chapman y Anderson 2005; Del Valls *et al.* 2003).

4.5. Técnicas TIE

Las técnicas TIE son una serie de métodos de fraccionamiento diseñados para caracterizar, de una manera precisa, los compuesto(s) químicos responsable(s) de la toxicidad de una muestra. Para ello se reduce o se elimina la biodisponibilidad de los contaminantes mediante manipulaciones físicas y químicas (USEPA 1991).

Los tres grupos de contaminantes más característicos de los sedimentos tóxicos son los compuestos orgánicos, los metales y el amonio, por lo que se utilizaron manipulaciones dirigidas

a reducir estos compuestos. En el caso de los elutriados también se airearon para poder inferir si los responsables de la toxicidad eran los compuestos volátiles. Los tratamientos que se han aplicado a las muestras están descritos en USEPA (2007). Por lo tanto, para cada muestra partimos inicialmente de dos submuestras, la muestra original (sin manipular) y la muestra tratada para los diferentes contaminantes (Fig. 4). Finalmente, cada muestra es testada mediante el correspondiente bioensayo, con el fin de observar la reducción en la toxicidad. La comparación con la muestra original permite determinar que tratamiento ha sido efectivo (si se ha reducido de manera significativa la toxicidad), y por tanto identifica el grupo de contaminantes responsable de la toxicidad.

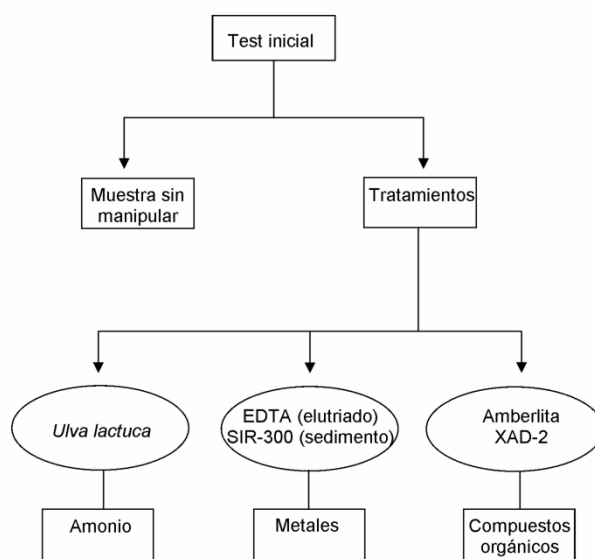


Figura 4. Esquema de las técnicas TIE, describiendo los diferentes tratamientos aplicados para cada grupo de contaminantes.

5. RESULTADOS (2009)

5.1 Columna de agua: DGTs y mejillones

La Figura 5 recoge los resultados de la concentración de metales en la columna de agua obtenida mediante los DGTs. Los resultados indican un orden decreciente entre los metales analizados $Zn > Cu > Cd > Pb$. En mayo, no se encontraron diferencias significativas entre estaciones para ningún metal ($p < 0.05$). En junio sin embargo, se observaron diferencias significativas entre estaciones en el caso de los cuatro metales, con concentraciones significativamente menores en la estación C, situada en la zona exterior del estuario. El análisis estadístico señaló la existencia de correlaciones significativas en la acumulación de Cd y Pb ($p < 0.01$) y Cu y Zn ($p < 0.01$) en junio.

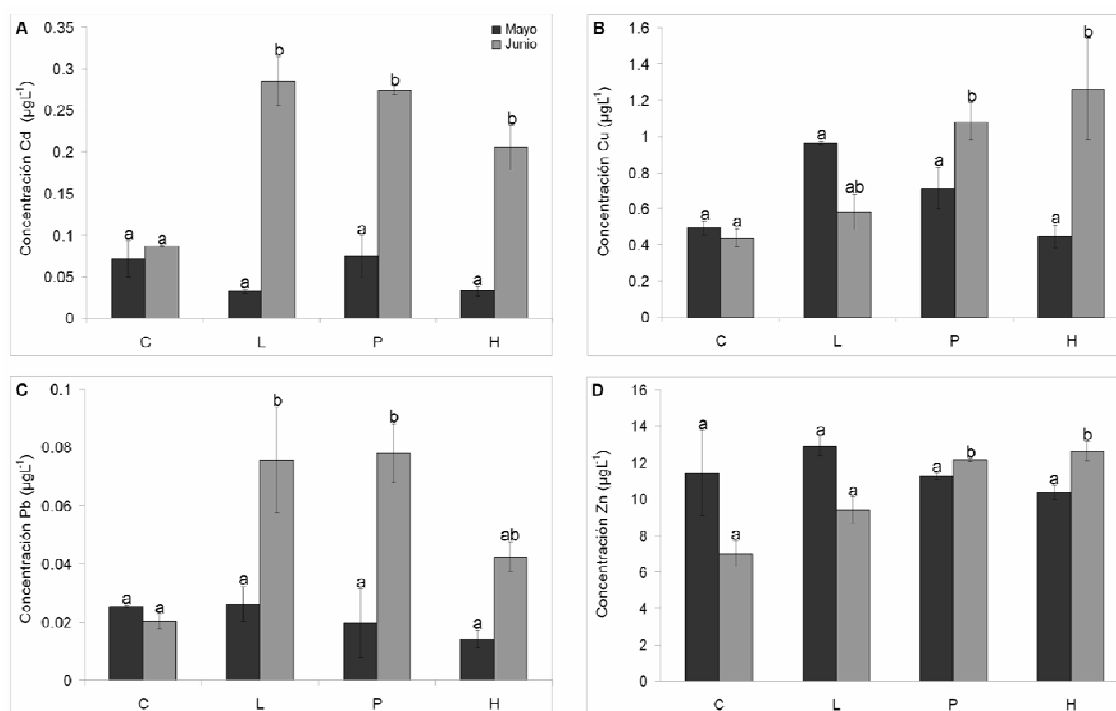


Figura 5. Fracción disuelta de metales en la columna de agua, medida mediante los DGTs; A) Cadmio, B) Cobre, C) Plomo y D) Zinc. Los datos están representados como promedio \pm error estándar. Los datos de mayo y junio son independientes y los valores con una misma letra no presentan diferencias significativas (ANOVA; Bonferroni $p < 0.05$).

En cuanto a las concentraciones medidas en los tejidos de los mejillones, la tendencia fue $Zn > Cu > Pb = Cd$ (Fig. 6). No pudo realizarse ningún análisis estadístico por carecer de réplicas, ya que los 20 organismos de cada estación fueron homogenizados en una única muestra. En el caso del Cd, tras 10 días en el medio, la concentración en los tejidos disminuyó, incrementando solamente a valores superiores de los de referencia tras un mes, en la estación L. Contrariamente, la concentración de Cu, Zn y Pb en los tejidos aumentó tras diez días en el medio, y la concentración de Zn y Pb disminuyó tras un mes. Con respecto a las diferencias encontradas entre los meses de mayo y junio tras 10 días de exposición, se observa en general mayor bioacumulación de Cu, Pb y Zn en los tejidos de los mejillones expuestos en mayo con respecto a junio.

No se encontraron correlaciones significativas entre la concentración de metales en los tejidos de los mejillones y la concentración lábil disuelta medida mediante los DGTs. Sin embargo, se observó una tendencia positiva en el caso del Cu ($F_{cor}=0.54$) y negativa para el Pb ($F_{cor}=-0.56$).

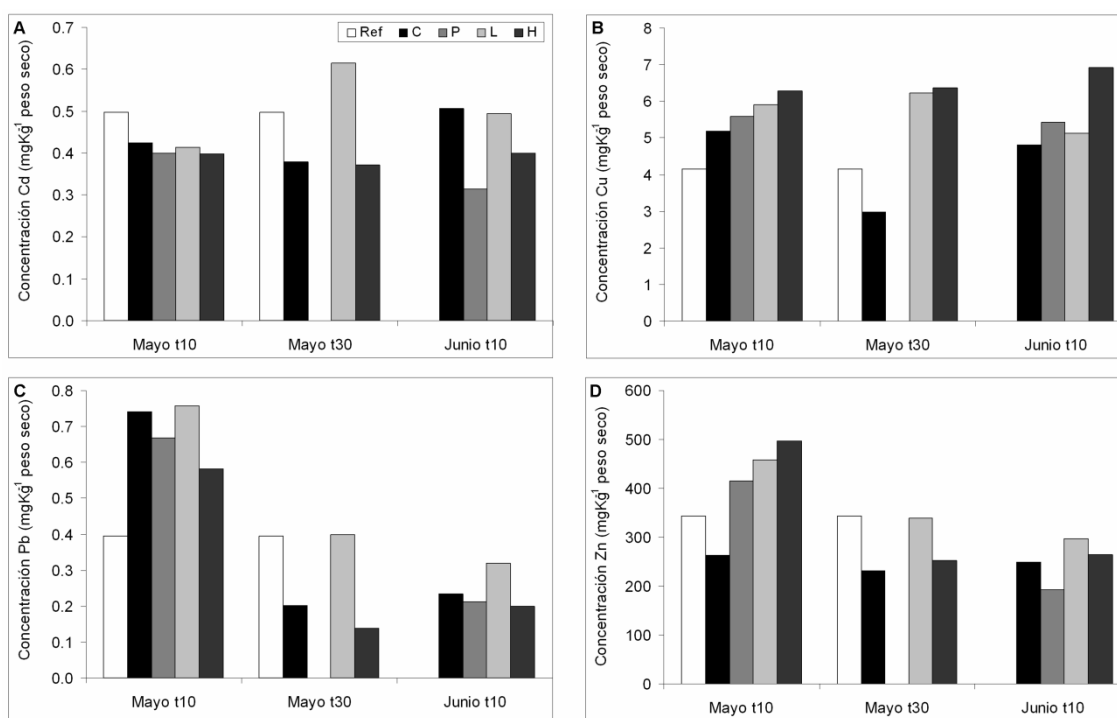


Figura 6. Concentración de metales en los tejidos de mejillón. A) Cadmio, B) Cobre, C) Plomo y D) Zinc. Los datos corresponden a una muestra compuesta (n=20). En blanco están representados los valores de fondo (pre-trasplante).

5.2 Sedimentos: bioensayos y técnicas TIE

La concentración de metales medidas en los sedimentos del estuario del Oiartzun se recoge en la Tabla 1. Las estaciones interiores presentaron las concentraciones más altas de metales, mientras que en la estación C, situada en la bocana del estuario, se encontraron las concentraciones más bajas de todos los metales. En general, se observó un gradiente decreciente desde el interior al exterior del estuario, con las concentraciones más altas en las estaciones H y L, una situación intermedia en la estación P y las concentraciones más bajas en la estación C.

Tabla 1. Concentración de metales (mg kg^{-1}) en los sedimentos del estuario del Oiartzun (estaciones C, P, L, H).

	C	P	L	H
Cd (mgkg^{-1})	0.40	0.69	0.60	1.34
Cu (mgkg^{-1})	86.15	171.65	121.48	178.42
Zn (mgkg^{-1})	249.57	473.32	554.39	750.32
Pb (mgkg^{-1})	30.43	47.98	62.15	191.53

Los resultados de los bioensayos con anfípodos y erizos han sido representados en la Figura 7. En el bioensayo de anfípodos (Fig. 7; A1), los sedimentos provenientes de las estaciones P, L y H resultaron tóxicos; con una diferencia en el porcentaje de mortalidad mayor que el 20% con respecto al control y diferencias estadísticamente significativas. Las muestras que resultaron tóxicas se trataron mediante las técnicas TIEs, con el fin de identificar el grupo de contaminantes responsable de la toxicidad observada. Se aplicaron tres tratamientos a cada una de las muestras y se compararon los resultados obtenidos en cada estación con los de la muestra sin tratar para determinar si alguno de los tratamientos había reducido la toxicidad (Fig. 7; A2). En el caso de la estaciones P y H, hubo una reducción significativa (ANOVA; $p < 0.05$) en la mortalidad de los anfípodos cuando las muestras se trataron para reducir la biodisponibilidad de metales (SIR-300) y compuestos orgánicos (XAD-2). En el caso de L, solo la resina XAD-2 redujo la mortalidad significativamente (ANOVA; $p < 0.05$).

En el caso del bioensayo de erizos llevado a cabo en los elutriados de los sedimentos, solamente la muestra H fue considerada tóxica (Fig 7; B1) y por tanto tratada con las técnicas TIE (Fig. 7; B2).

El desarrollo embrionario mejoró significativamente tras retirar el amonio del elutriado mediante el alga *Ulva* (incremento del desarrollo larvario hasta el 60%), sin embargo la mejoría no alcanzó los niveles del control (alrededor del 90%), por lo que el amonio estaba enmascarando un segundo grupo de contaminantes.

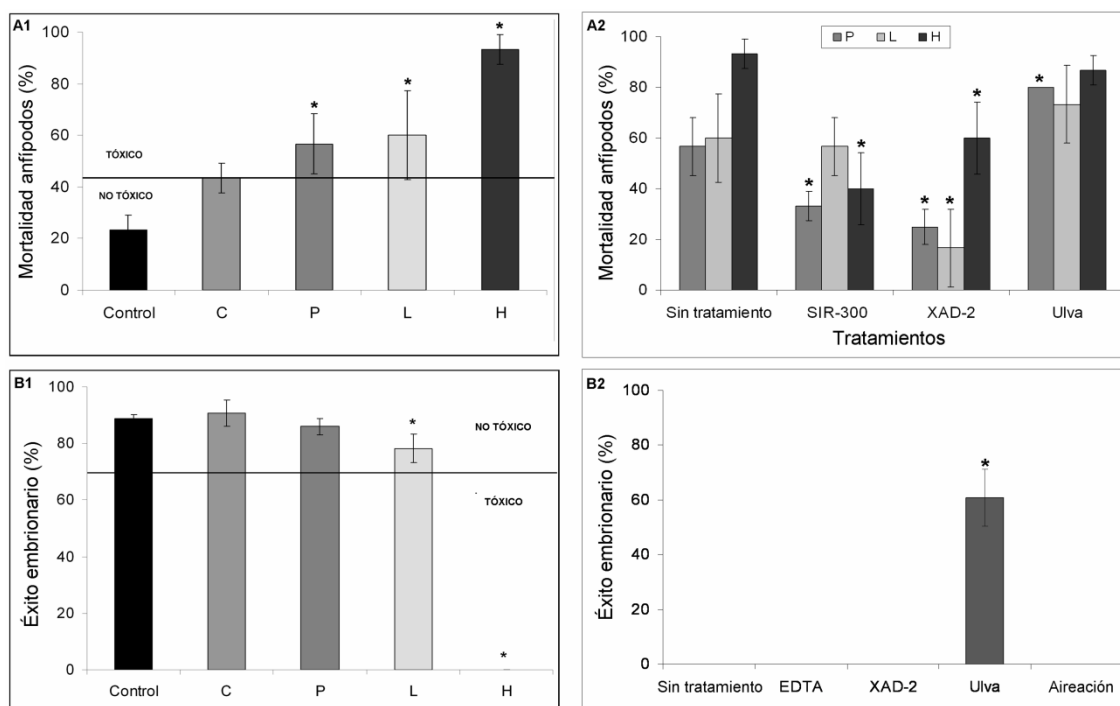


Figura 7. Ensayos ecotoxicológicos realizados con el anfípodo *Corophium multisetosum* (A) y erizos *Paracentrotus lividus* (B). Se han representado los resultados de los tratamientos de las técnicas TIEs en sedimentos (A2) y elutriados (B2); SIR-300 (metales), XAD-2 (compuestos orgánicos), *Ulva* (amonio) y aireación (compuestos volátiles). La línea marca la diferencia de 20% en la mortalidad con respecto al control. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (A1 y B1) o con respecto a las muestras sin tratamiento (A2 y B2) (ANOVA; $p < 0.05$).

6. DISCUSIÓN (2009)

No hay datos previos de DGTs en esta área que permitan su comparación con los resultados obtenidos en este estudio. Sin embargo, las concentraciones medidas en este trabajo son comparables con las medidas de DGTs obtenidas por diversos autores en estuarios y zonas costeras de todo el mundo.

En este estudio, se observó una disminución en la concentración de metales en los tejidos de los mejillones de mayo t10 (10 días de exposición en el medio) a mayo t30 (1 mes de exposición). Se ha observado que en ocasiones los mejillones tienen una tasa de acumulación elevada cuando son transplantados pero que luego se ve reducida tras un tiempo de estancia en el medio (Webb y Keough 2002), lo que podría explicar la tendencia observada en este caso. Por lo tanto, la toma de decisiones basadas en un único momento de muestreo podría suponer la subestimación o sobrestimación de la concentración real de los metales en la columna de agua.

No se observaron correlaciones significativas entre la concentración de metales medida mediante los DGTs y la medida en los tejidos de mejillón, lo que subraya una vez más, la diferencia en la acumulación de las diferentes técnicas. Por ejemplo, en el caso del Pb la tendencia es negativa ($r_{\text{cor}} = -0.56$), indicando que las dos técnicas están midiendo diferentes especies de Pb. El plomo es un metal que suele aparecer asociado a partículas, que podrían ser accesibles para los mejillones mediante la filtración pero no para los DGTs (Leung *et al.* 2008). La comparación entre mejillones y DGTs es complicada, pero los DGTs nos han permitido discriminar más fácilmente que estaciones están más impactadas. Así, con los DGTs concluiríamos que C es la estación menos impactada mientras que las estaciones del interior del estuario (L,P y H) tienen una carga de contaminación por metales mayor. Además, los mejillones expuestos a ambientes extremos (ej. altamente contaminados) sufren alteraciones fisiológicas que afectan su capacidad de bioacumular (Leung *et al.* 2008), lo que podría explicar los resultados anómalos obtenidos en este estudio: concentraciones de metales mayores tras diez días que tras un mes de estancia en el medio. Al contrario, los DGTs no sufren los efectos de las variaciones de las condiciones ambientales y acumulan de una manera reproducible. Otra ventaja de los DGTs es que el valor final lo ofrecen como concentración de metales disueltos (μgL^{-1}), demandado por las directrices europeas, mientras que los mejillones ofrecen concentración de metales en los tejidos, lo que es difícil de traducir a concentraciones reales en el agua.

Con el fin de hacer una interpretación integrada de los resultados y de la calidad de la masa de agua del Oiartzun se han integrado las diferentes líneas de estudio en la Figura 8. Se han representado los tiempos de residencia en diferentes partes del estuario, como un descriptor de la hidrodinámica del sistema, y se exponen los resultados de DGTs, las concentraciones de los contaminantes en el sedimento y la toxicidad de los bioensayos y los resultados de las técnicas TIEs.

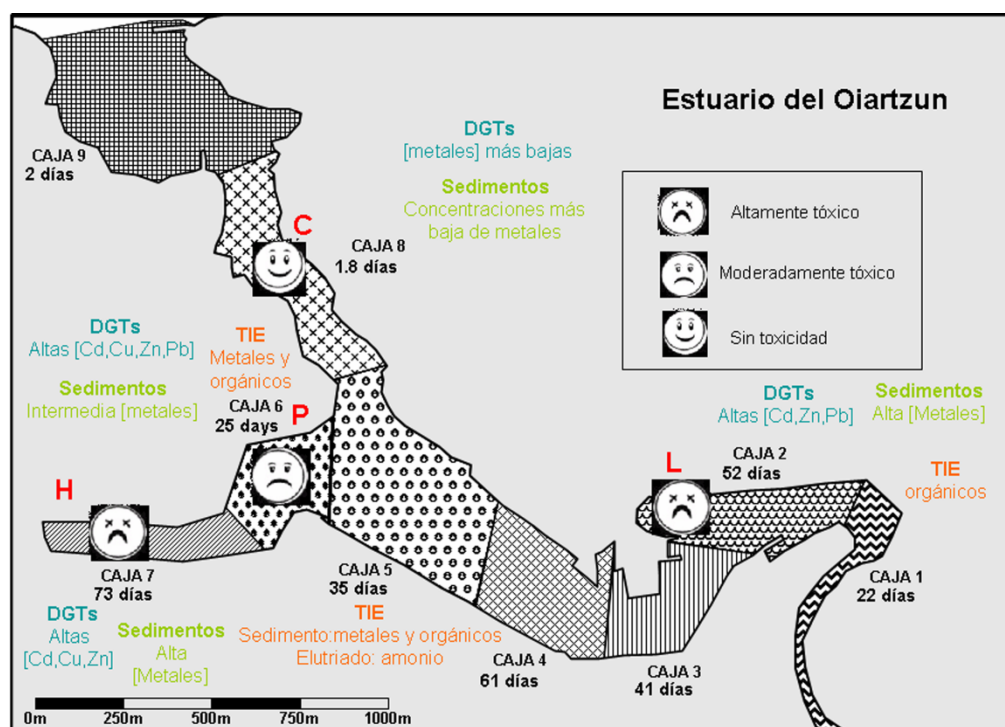


Figura 8. Integración de las diferentes líneas de evidencia.

Puede concluirse que la estación C, que presenta las concentraciones más bajas de metales en el agua (DGTs) y en el sedimento, no presentó toxicidad para ninguno de los bioensayos. Al contrario, en las estaciones interiores del estuario (P, L y H), se midieron concentraciones altas de metales en el agua mediante DGTs y en el sedimento, con una toxicidad asociada en el rango de moderadamente a altamente tóxica. Además, los metales cuya concentración es mayor en el agua son el Cu y el Zn, lo que coincide con su enriquecimiento en los sedimentos. Esto indica la interrelación entre los dos compartimentos, subrayando la necesidad de considerar ambos cuando evaluamos la calidad de una masa de agua, especialmente en aquellas impactadas por actividades que pueden removilizar el sedimento (e.g. dragados, movimiento de barcos...).

En este estudio se ha demostrado que la aplicación de estas técnicas que se basan en la fracción biodisponible de los contaminantes (i.e. DGTs, bioensayos y técnicas TIE) ha permitido obtener

una información precisa de la distribución de los contaminantes y de su potencial toxicidad dentro de este sistema. Además este enfoque multidisciplinar ha permitido la evaluación integrada de la calidad de la masa de agua del Oiartzun.

7. CONCLUSIONES (2009)

La interpretación de los resultados obtenidos en mejillones conlleva una serie de dificultades debido a la influencia de factores abióticos y bióticos en los biomonitores (no se observó un gradiente claro).

La influencia de estos factores disminuye con el uso de los DGTs, por lo que ésta técnica se muestra más ventajosa con respecto a los biomonitores para determinar la distribución de metales en aguas (se observó un gradiente claro).

La información obtenida mediante los DGTs se refiere a la fracción lábil de los metales, la cual está relacionada con la posible afección a la biota.

Mediante la realización de bioensayos en sedimentos y en el elutriado se obtiene una relación directa entre contaminación y respuesta biológica (toxicidad), pero es necesario la aplicación de técnicas TIE para identificar los contaminantes causantes de la toxicidad y establecer relaciones causa-efecto.

Resumen de las tareas realizadas en el 2009

1. Instalación de dispositivos DGTs en 4 estaciones del Oiartzun
2. Instalación de biomonitores (mejillones) procedentes de una zona limpia en las estaciones de estudio.
3. Análisis de metales (Cd, Cu, Pb y Zn) acumulados en DGTs y en biomonitores.
4. Muestreo de sedimentos y caracterización físico-química y toxicológica de los mismos:
 - Análisis de Cd, Cu, Pb y Zn en sedimentos
 - Aplicación de técnicas TIE (Toxicity Identification Evaluation) para la identificación de la toxicidad
 - Realización de bioensayos en fase sólida y en el elutriado

8. MATERIAL Y MÉTODOS APLICADOS PARA EL DESARROLLO DEL OBJETIVO 3 (2010)

8.1 Área de estudio y campañas de muestreo en 2010

La concentración de metales en la columna de agua se evaluó mediante DGTs en 13 estuarios de la costa vasco-francesa entre enero y junio del 2010 (Fig. 9). Se localizaron dos estaciones en cada estuario delimitando la zona de influencia mareal, que a partir de ahora denominaremos como interior y exterior. Las estaciones interiores se localizaron en el punto límite de influencia mareal. Las estaciones exteriores se situaron en la parte más exterior y de fácil acceso de los estuarios. En general, las estaciones interiores eran oligohalinas (con la excepción del Nervión, Butrón, Lea y Oria) y por tanto sin cambios bruscos en la salinidad, y en cambio las exteriores eran altamente variables al estar muy influenciadas por los ríos, en el rango mesohalino-polihalino (excepción del Nervión y el Oiartzun donde las estaciones eran de carácter euhalino).

Al igual que en el 2009, se colocaron 3 DGTs en cada estación y se recogieron tras 10 días en el medio. Los metales que se estudiaron fueron el cadmio, cobre, níquel y zinc. El resto del procesado de las muestras ha sido anteriormente explicado en el apartado 3. Material y Métodos del ejercicio del 2009.

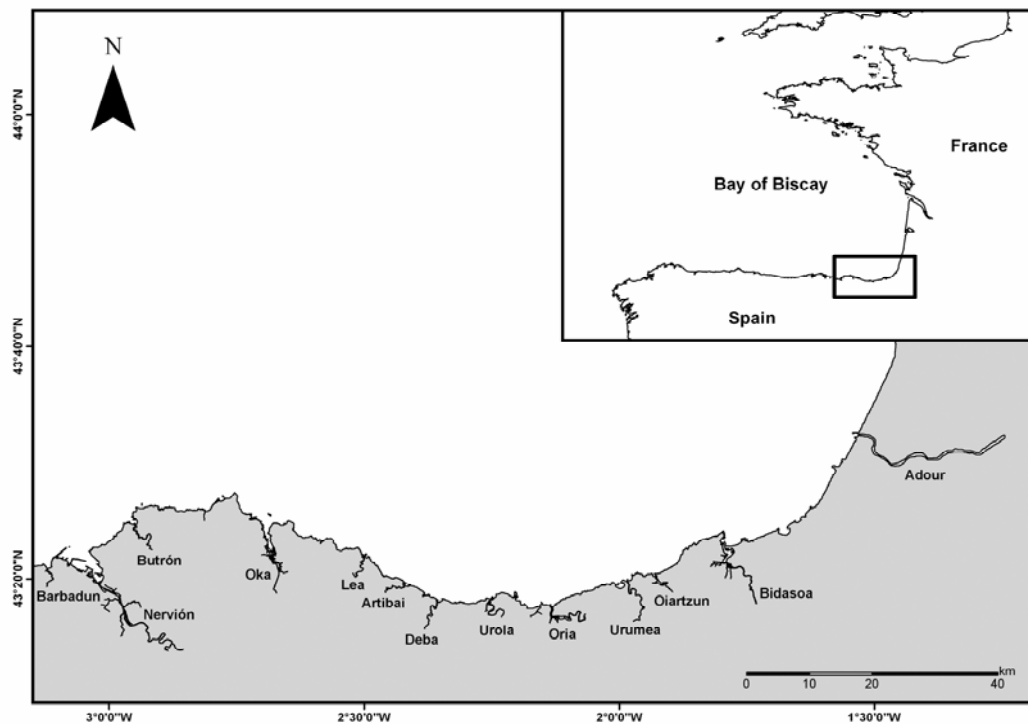


Figura 9. Mapa del suroeste del Golfo de Bizkaia, mostrando la localización de los 13 estuarios (Marine Pollution Bulletin, *in press*).

9. RESULTADOS (2010)

9.1 Concentración de metales medida mediante DGTs

La concentración de metales medida mediante DGTs, en las estaciones interiores y exteriores se ha representado en la Figura 10. Los datos se representan como la media \pm error estándar de la media (SEM). Sin embargo, en algunas estaciones los datos no pudieron procesarse en triplicado, por lo que en esos casos se calculó la media de dos valores o de un único valor.

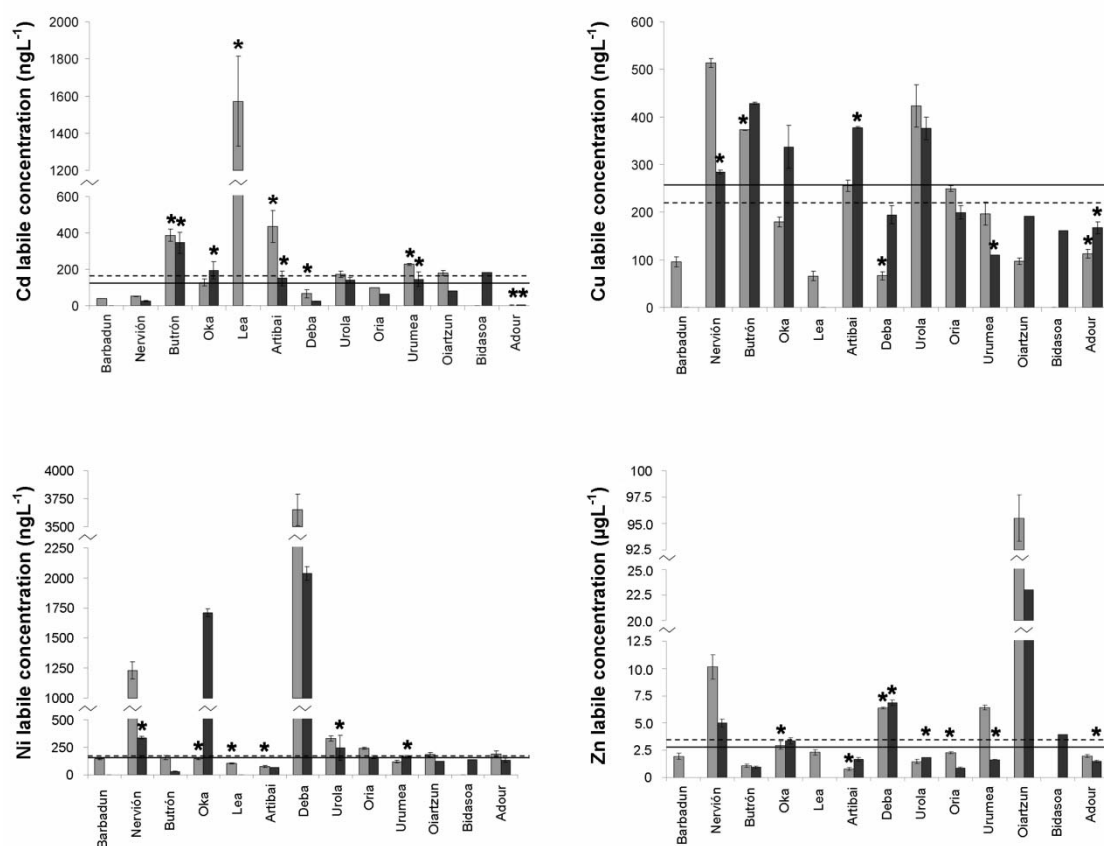


Figura 10. Concentraciones de metales medidas mediante DGTs en los 13 estuarios del Golfo de Bizkaia. Los datos se han representado como la media \pm SEM ($n = 3$). Las estaciones interiores se han representado mediante barras grises y las exteriores mediante barras negras. Las líneas intermitente y sólida representan los valores ‘umbral’ para las estaciones interiores y exteriores, respectivamente. Clave: (*) representa la media de dos valores; la ausencia de barras de error indica que es un único valor. (Montero *et al.*, *in press*)

En general, las concentraciones más altas se midieron en las estaciones interiores para los cuatro metales. Hubo algunas excepciones, en las que la concentración más alta se midió en las estaciones exteriores, como fue el caso del cadmio en el Oka y en el Adour, el níquel en el Oka y en el Urumea y el zinc en el Oka, Artibai, Deba y Urola. En este sentido, seis estuarios presentaron concentraciones de cobre más altas en la zona exterior (Butrón, Oka, Artibai, Deba, Oiartzun y Adour).

Al no haber datos de DGTs previos en esta zona, se calcularon valores ‘umbral’, que permitiesen la comparación entre los estuarios de estudio y establecer diferencias en la contaminación. Se calculó un ‘umbral’ interior y otro exterior, representando cada uno la media para cada metal encontrado en las estaciones interiores y exteriores, respectivamente (Fig. 10). Algunos valores no se tomaron en cuenta para calcular estos valores ‘umbral’ ya que se identificaron como valores atípicos (Grubb’s test, $p < 0.05$): cadmio (Lea interior), níquel (Nerviión interior, Oka exterior y Deba interior y exterior) y zinc (Oiartzun interior y exterior). Las concentraciones de metales medidas en cada estación se compararon con los valores ‘umbral’ calculados en este estudio (Fig. 10).

9.2 Calidad del agua de los estuarios

En la Figura 11 se ha representado el estado general de cada estuario según la concentración de metales medidos mediante los DGTs. Para ello, se consideró de número de metales que tenía una concentración por encima de los valores ‘umbral’ en cada estuario. Los puntos azules indican que un único metal o ninguno superaron los valores ‘umbral’. El verde se seleccionó para aquellos estuarios con uno o dos metales por encima de los valores ‘umbral’ y el rojo para aquellos estuarios con más de dos metales por encima de los valores ‘umbral’. Así, los estuarios que presentaron mayor número de metales por encima de los valores ‘umbral’ fueron el Nerviión (Cu, Ni y Zn en la estación interior y exterior), Oka (Cd, Cu, Ni y Zn en la estación exterior), Urola (Cd, Cu y Ni en la estación interior y exterior) y Oiartzun (Cd, Ni y Zn en la estación interior).

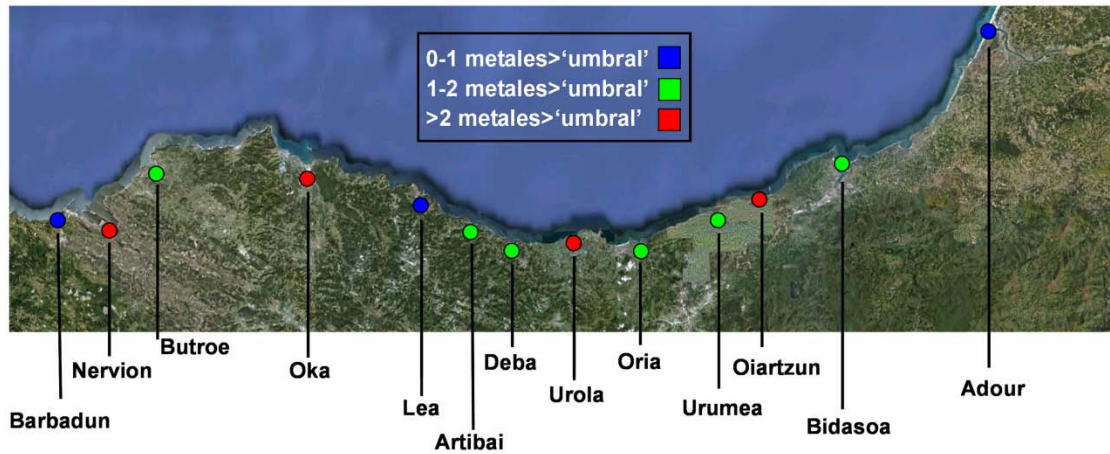


Figura 11. Clasificación de los estuarios basada en la concentración de metales medidos mediante DGTs. Los diferentes colores representan el número de metales que se encuentran por encima de los valores 'umbral' calculados en este estudio.

10. DISCUSIÓN (2010)

En general la concentración de los metales fue mayor en las estaciones interiores que en las exteriores. Esto era previsible ya que la contaminación de origen continental se diluye en dirección al mar gracias a la renovación de agua limpia que tiene lugar con las mareas (Dunn *et al.* 2007). El cobre es el único metal que presentó una concentración 'umbral' superior en las estaciones exteriores que en las interiores (Fig. 10). Esto podría deberse al cobre proveniente de las pinturas antifouling que se utilizan en los cascos de los barcos (Warnken *et al.* 2004; Dunn *et al.* 2007), ya que los estuarios en los que la concentración de este metal es más alta en el exterior (i.e. Butrón, Oka, Artibai, Deba, Oiartzun y Adour) corresponde con aquellos estuarios que tienen grandes puertos deportivos o comerciales en esta zona del estuario.

Esta es la primera vez que se consiguen datos de DGTs en todos los estuarios del País Vasco. Estos valores pueden compararse con los obtenidos por otros autores a nivel mundial. Las concentraciones más altas de cadmio medidas hasta la fecha corresponden a la laguna de Bages en Francia (63–65 ng L⁻¹; Gonzalez *et al.* 2009) y a unas marinas en Melbourne (10–80 ng L⁻¹; Webb y Keough 2002). Los valores de cadmio medidos en este estudio fueron bastante más altos, lo que está en concordancia con la bibliografía de esta zona, basada en muestras discretas de agua, que incide en que los estuarios vascos no alcanzan el buen estado químico en las aguas debido a la contaminación por cadmio (Tueros *et al.* 2009). En el caso del cobre, níquel y zinc, los valores 'umbral' que hemos calculado en este estudio están en concordancia con los encontrados por otros autores mediante DGTs en zonas estuáricas y costeras (e.g., Webb y Keough 2002; Dunn *et al.* 2003; Warnken *et al.* 2004).

Además, los estuarios se han clasificado dependiendo del número de metales cuya concentración se encontraba por encima de los valores 'umbral' calculados para las estaciones interiores y exteriores (Fig. 11). Borja *et al.* (2006) clasificó los estuarios del País Vasco considerando el número de impactos antropogénicos presentes en cada uno de ellos. De acuerdo con esta clasificación, los estuarios del Nervión y del Oiartzun presentan el mayor número de presiones, ya que en ellos se encuentran los puertos comerciales más importantes de la zona al igual que los núcleos urbanos más grandes. Esto explicaría que se encuentren tres metales por encima de los valores 'umbral' (Fig. 10): el Cu, Ni y Zn en el caso del Nervión y el Cd, Ni y Zn en el caso del Oiartzun. En cuanto al Urola, sufre un número moderado de impactos y sin embargo según los DGTs, presenta tres metales (Cd, Cu y Ni) por encima de los valores 'umbral'. Estudios previos

mediante otras técnicas de monitoreo han determinado que este estuario no alcanza los objetivos de la DMA en el agua debido a las altas concentraciones de cadmio (Tueros *et al.* 2009). En el caso del Cu y el Ni, podrían provenir de los sedimentos, en los que se encuentran altas concentraciones de estos metales (Solaun *et al.* 2009), o de las actividades de los astilleros y de la industria galvánica presente en la zona. En cuanto al Oka, Lea y Barbadun, se identifican un número limitado de presiones comparado con los demás estuarios. Tanto el estuario del Lea como el del Barbadun se han clasificado como los menos contaminados basándose en los resultados de los DGTs. Sin embargo, en el Oka se encontraron cuatro metales por encima de los valores 'umbral' aunque en general este estuario no presente un número alto de presiones. Alguna vez se ha observado que el estuario del Oka presenta niveles altos de cadmio en el agua (Tueros *et al.* 2009). La alta concentración de metales en la columna de agua del Oka podría deberse al elevado tiempo de residencia del agua (63 días). Como el agua se renueva poco dentro del estuario, la persistencia de los contaminantes dentro del mismo será bastante grande, lo que podría derivar en una alta concentración de los metales.

11. CONCLUSIONES (2010)

Estos resultados demuestran que mediante los DGTs se logra una información precisa de la concentración lábil de los contaminantes en sistemas altamente dinámicos. Además estos resultados representan la integración de la variabilidad temporal en la concentración de metales ocurrida durante 10 días, lo que permite determinar de una forma fiable que estuarios presentan un mayor grado de contaminación. La clasificación de la calidad de los estuarios basada en los resultados de DGTs está en concordancia con la contaminación histórica de esta área y los resultados obtenidos mediante otros métodos de monitoreo. Por lo tanto, con este estudio podemos concluir que los DGTs parecen ser una buena herramienta para establecer el estado químico de las aguas de transición y costeras dentro de la Directiva Marco del Agua.

Resumen de las tareas realizadas en el 2010

Las tareas realizadas en 2010 se han orientado a dar cumplimiento al objetivo 3 de este proyecto:

- estudio de la viabilidad del uso de dispositivos de muestreo pasivo para la evaluación del estado químico de las aguas de transición y costeras.
1. Instalación de dispositivos DGTs en los 12 estuarios del País Vasco y en el estuario del Adour, en la zona interna y en la bocana de cada uno de los estuarios, cubriendo un amplio rango de salinidad.
 2. Análisis de metales acumulados en los DGTs instalados en los 13 estuarios.
 3. Participación en un ejercicio de intercalibración en Francia, en la laguna de Thau (Sète) y en Ternay (Lyon).

12. EJERCICIO DE INTERCALIBRACIÓN (2010)

12.1 Introducción

En el 2010 se organizó un ejercicio de intercalibración en el marco del programa AQUAREF (<http://www.aquaref.fr>), cuyo objetivo principal era la intercalibración del uso de los muestreadores pasivos entre laboratorios expertos que trabajan en el desarrollo y aplicación de estos dispositivos. Algunos de los participantes de este ejercicio se recogen a continuación:

- CEFAS y Environment Agency, National Laboratory Service (Reino Unido)
- CEMAGREF, IFREMER e INERIS (Francia)
- DELTARES (Holanda)
- UFZ - Department of Ecological Chemistry, Helmholtz Centre for Environmental Research (Alemania)
- Universidad de Cagliari (Italia)
- Water Research Institute (Eslovaquia)
- T. G. Masaryk Water Research Institute, Public Research Institution (República Checa)
- NIVA (Noruega)

Los objetivos de este ejercicio de intercalibración eran evaluar el potencial y eficiencia de los diferentes muestreadores pasivos (para metales, compuestos orgánicos y pesticidas) para la medición de los contaminantes en las aguas continentales y marinas en el marco de la DMA. Los objetivos operacionales eran (i) evaluar la comparabilidad y variabilidad de las medidas realizadas, de las sustancias prioritarias, mediante los muestreadores pasivos, (ii) evaluar la idoneidad de los muestreadores implementados en los diferentes ambientes acuáticos para la medida de las sustancias seleccionadas y (iii) demostrar la aplicabilidad de estas herramientas para los gestores de las masas de agua y de los laboratorios encargados de los análisis rutinarios.

12.2 Material y métodos

AZTI-Tecnalia solo participó en la medida de metales mediante los DGTs, aunque también se pusieron dispositivos para la medida de compuestos orgánicos y pesticidas. En el caso de los

metales se eligieron dos áreas de estudio (Fig. 12) situadas en Francia, una laguna marina (Thau en Sète) y un río (Rhône en Ternay).

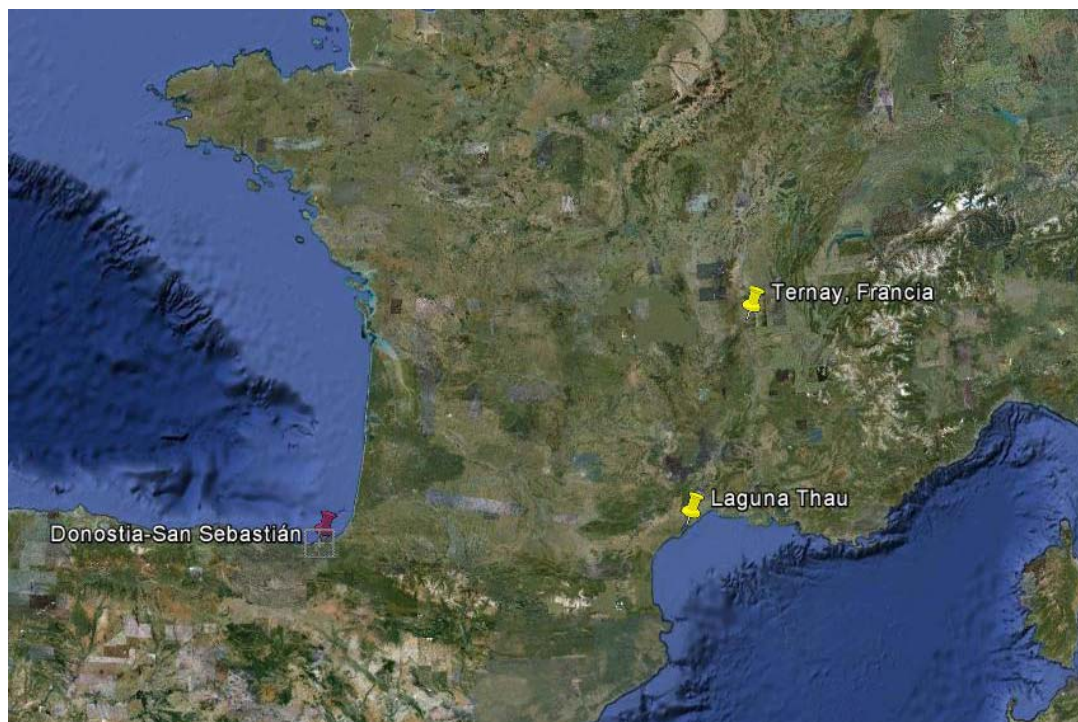


Figura 12. Mapa donde se han representado en amarillo las zonas donde se colocaron los muestreadores pasivos.

Cada laboratorio participante debía enviar al laboratorio responsable de cada muestreo cuatro DGTs. Tres que se colocarían en el medio y uno que se utilizaría como ‘control de campo’. El día del muestreo se colocaron los muestreadores de cada laboratorio participante (Fig. 13) y además se llevaron los ‘controles de campo’, que se manipularon de la misma manera que los dispositivos que iban a ser colocados en el medio. Estos ‘controles de campo’, en vez de colocarse en el medio se llevaron de vuelta al laboratorio y sirvieron para indicar si había habido algún tipo de contaminación en el viaje y manipulación de los dispositivos antes de ser colocados en el medio.



Figura 13. Estructura en la que se colocaron los dispositivos de muestreo pasivo en la laguna Thau (A). B) SPMDs utilizados para medir los compuestos orgánicos y C) los DGTs utilizados para la medición de los metales.

Tanto en el caso de la laguna Thau (27 de Abril- 4 de Mayo) como en Ternay (17 al 24 de Junio), los DGTs se mantuvieron en el medio durante 7 días. Durante el tiempo de estancia de los muestreadores pasivos en el medio se analizaron los siguientes parámetros:

- Las concentraciones disueltas y totales de las sustancias prioritarias (mediante muestreo convencional de muestras discretas de agua)
- pH, material en suspensión, conductividad, salinidad (en Thau), DOC, TOC temperatura, velocidad del agua, pluviometría, oxígeno disuelto (en Thau).

El resto del proceso tras la retirada de los DGTs del medio ha sido explicado con anterioridad. La única diferencia es que en este caso desde AQUAREF/INERIS se envió una solución estándar a cada laboratorio con el fin de evaluar el proceso de las analíticas en el laboratorio. En este estudio se analizaron los siguientes metales: cadmio, cobre, plomo, níquel, zinc, cobalto, cromo y manganeso.

12.3 Resultados y discusión

Los resultados preliminares del ejercicio de intercalibración se han presentado recientemente en Nantes (23-24 de Noviembre de 2011). Tras discutir las ventajas y desventajas de los muestreadores pasivos, se ha observado que en algunos casos ofrecen una información valiosa que no puede obtenerse mediante otras técnicas de muestreo. Esto es especialmente importante

en aquellos medios que presentan concentraciones traza de metales y aquellos sistemas altamente dinámicos, ya que el muestreo convencional no es capaz de representar fidedignamente las condiciones del medio.

En la actualidad el grupo de DELTARES (Holanda) en colaboración con el gobierno holandés está trabajando en un 'position paper' enumerando las ventajas de los muestreadores pasivos para orgánicos y el desarrollo actual de estas técnicas para que sea evaluado su uso dentro de la Directiva Marco del Agua y de la Estrategia Marina Europea. Asimismo, se ha planteado que los resultados y conclusiones obtenidos en el ejercicio de intercalibración de AQUAREF podrían incluirse en ese 'position paper', con el fin de incluir la información obtenida en este ejercicio con respecto a los muestreadores pasivos para metales.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Beiras, R., Vazquez, E., Bellas, J., Lorenzo, J.I., Fernández, N., Macho, G., Mariño J.C., Casas, L., 2001. Sea-urchin embryo bioassay for in situ evaluation of the biological quality of coastal seawater. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 52: 29-32.
- Blott, S.J., Pye, K., 2001. GRADISTAT: a grain size distribution and statistics package for the analysis of unconsolidated sediments. *Earth Surface Processes and Landforms* 26, 1237-1248.
- Borja, A., Galparsoro, I., Solaun, O., Muxika, I., Tello, E.M., Uriarte, A., Valencia, V., 2006. The European Water Framework Directive and the DPSIR, a methodological approach to assess the risk of failing to achieve good ecological status. *Estuarine Coastal Shelf Sci.* 66, 84-96.
- Casado-Martínez, M.C., Campisi, T., Díaz, A., Lo Re, R., Obispo, R., Postma, J.F., Riba, I., Sneekes, A.C., Buceta, J.L., Del Valls, T.A., 2006a. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. II. Bioluminescence inhibition test for rapid sediment toxicity assessment. *Cienc. Mar.* 32, 1-10.
- Casado-Martínez, M.C., Beiras, R., Belzunce, M.J., González-Castromil, M.A., Marín-Guirao, L., Postma, J.F., Riba, I., Del Valls, T.A., 2006b. Interlaboratory assessment of marine bioassays to evaluate the environmental quality of coastal sediments in Spain. IV. Whole sediment toxicity test using crustacean amphipods. *Cienc. Mar.* 32, 149-157.
- Chapman, P.M., Anderson, J., 2005. A Decision-Making Framework for Sediment Contamination. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 3, 63-173.
- Davison, W., Zhang, H., 1994. *In situ* speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature* 367, 546-548.
- Del Valls, T.A., Casado-Martínez, M.C., Riba, I., Martín-Díaz, M.L., Forja, J.M., García-Luque, E., 2003. Investigación conjunta sobre la viabilidad de utilizar ensayos ecotoxicológicos para la evaluación de la calidad ambiental del material de dragado. Technical Report for CEDEX. Puerto Real, Cádiz.
- DGT Research, 2003. DGT- for measurements in waters, soils and sediments. <http://dgtresearch.com/dgtresearch/dgtresearch.pdf>

- Directive 2000/60/EC of the European Parliament and the Council of 23 October 2000. A framework for community action in the field of water policy. Off. J. Eur. Commun. L327, 72 pp.
- Dunn, R.J.K., Teasdale, P.R., Warnken, J., Schleich, R.R., 2003. Evaluation of the Diffusive Gradient in a Thin Film Technique for monitoring trace metal concentrations in estuarine waters. *Environ. Sci. Technol.* 37, 2794-2800.
- Dunn, R.J.K., Teasdale, P.R., Warnken, J., Jordan, M.A., Arthur, J.M., 2007. Evaluation of the *in situ*, time-integrated DGT technique by monitoring changes in heavy metal concentrations in estuarine waters. *Environ. Pollut.* 148, 213-220.
- Environment Canada, 1992. Biological test method. Fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars). Environmental Protection Series. Report: EPS 1/RM/27, Canada. 99 p.
- Garofalo, E., Ceradini, S., Winter, M., 2004. The use of Diffusive Gradients in Thin-Film (DGT) passive samplers for the measurement of bioavailable metals in river water. *Ann. Chim.* 94, 515-520.
- Gonzalez, J-L., Turquet, J., Cambert, H., Budzinski, H., Tapie, N., Guyomarch, J., Andral, B., 2009. Projet PEPS La Réunion (Pré étude: Echantillonnage Passif pour la Surveillance de la contamination chimique). Mise en place d'échantillonneurs passifs pour la caractérisation de la contamination chimique des masses d'eau côtières réunionnaises. Rapport Convention Ifremer/DIREN Contrat n° 07/1216859/F. 89 pp.
- Holme, N.A., McIntyre, A.D., 1971. Methods for the study of marine benthos. Blackwell, Oxford, pp. 323.
- Kristensen, E. y F. Ø. Andersen, 1987. Determination of organic carbon in marine sediments: a comparison of two CHN-analyzer methods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 109: 15-23.
- Leung, K.M.Y., Furness, R.W., Svavarsson, J., Lau, T.C. and Wu, R.S.S., 2008. Field validation, in scotland and iceland, of the artificial mussel for monitoring trace metals in temperate seas. *Marine Pollution Bulletin* 57
- Meyer, J.S., 2002. The utility of the terms 'bioavailability' and 'bioavailable fraction' for metals. *Mar. Environ. Res.* 53, 417-423.
- Montero, N., Belzunce Segarra, M.J., González J.L., Larreta, J., Franco, J. Evaluation of Diffusive Gradients in Thin-Films (DGTs) as a monitoring tool for the assessment of the chemical status of transitional waters within the Water Framework Directive. *Mar. Poll. Bull. In press.*

- OSPAR, 2005. OSPAR Protocols on methods for the testing of chemicals used in the offshore oil industry. 26 p.
- Rodríguez, J. G., I. Tueros, Borja, A., Belzunce, M.J., Franco, J., Solaun, O., Valencia, V., Zuazo, A., 2006. Maximum likelihood mixture estimation to determine metal background values in estuarine and coastal sediments within the European Water Framework Directive. *Science of The Total Environment* 370(2-3): 278-293.
- Schintu, M., Durante, L., Maccioni, A., Meloni, P., Degetto, S., Contu, A., 2008. Measurement of environmental trace-metal levels in Mediterranean coastal areas with transplanted mussels and DGT techniques. *Mar. Pollut. Bull.* 57, 832–837.
- Schipper, C.A., Burgess, R.M., van den Dikkenberg, B., Kater, B.J., Stronkhost, J., 1999. Standard operating procedure specie-01 marine amphipod *Corophium volutator* mortality sediment toxicity test. National Institute for Coastal and Marine Management/RIKZ, pp. 16.
- Sherwood, J.E., Barnett, D., Barnett, N.W., Dover, K., Howitt, J., Li, H., Kew, P., Mondon, J., 2009. Deployment of DGT units in marine waters to assess the environmental risk from a deep sea tailings outfall. *Anal. Chim. Acta* 652, 215-223.
- Solaun, O., Belzunce, M.J., Franco, J., Valencia, V., Borja, A., 2009. Estudio de la contaminación en los sedimentos de los estuarios del País Vasco (1998-2001). RIM. 51 pp.
- Tueros, I., Borja, A., Larreta, J., Rodríguez, J.G., Valencia, V., Millán, E., 2009. Integrating long-term water and sediment pollution data, in assessing chemical status within the European Water Framework Directive. *Mar. Pollut. Bull.* 58, 1389-1400.
- USEPA, 1991. Methods for aquatic toxicity identification evaluations; Phase I toxicity characterization procedures. Duluth (MN) Office of Research and Development. EPA/600/6-91/003
- USEPA, 2007. Sediment toxicity identification evaluation (TIE) Phases I,II and III guidance document. Office of research and development. Washington, dc. Epa/600/r-07/080.
- Warnken, J., Dunn, R.J.K., Teasdale, P.R., 2004. Investigation of recreational boats as a source of copper at anchorage sites using time-integrated diffusive gradients in thin film and sediment measurements. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 833-843.
- Warnken, K.W., Zhang, H., Davison, W., 2007. *In situ* monitoring and dynamic speciation measurements in solution using DGT, in: Greenwood, R., Mills, G., Vrana, B. (Eds.), *Passive sampling techniques in environmental monitoring*. Elsevier, Amsterdam, pp. 251-278.

Webb, J.A., Keough, M.J., 2002. Measurement of environmental trace-metal levels with transplanted mussels and diffusive gradients in thin films (DGT): a comparison of techniques. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 222-229.

14. ANEXO: LOGROS CIENTÍFICOS Y DIFUSIÓN

- Presentación de resultados en la DGT International Conference, Universidad de Cagliari (octubre 2009): *Application of DGTs and TIE techniques for labile metal fraction evaluation, as an ecotoxicological assessment approach: an example in a Spanish Estuary.*

- Presentación de resultados en el ICES Working Group on Marine Sediments in Relation to Pollution (WGMS) (San Sebastián, marzo 2010): *Application of DGTs, mussels and TIE techniques for contaminant labile fraction evaluation, as an environmental assessment approach: an example in a Spanish Estuary.*

- Presentación de resultados obtenidos en la caracterización del Oiartzun en el Symposium Internacional de Oceanografía del Golfo de Vizcaya, en Brest (mayo 2010): *Advances in tools for harbour water quality Management*

- Presentación de resultados en el SETAC (Sevilla, mayo 2010): *Assessing the quality of a Basque estuary (Oiartzun, North of Spain) using a battery of chemical and ecotoxicological tools.*

- Presentación de resultados en el Symposium Internacional Estuarine and Coastal Sciences Association, Figueira da Foz (septiembre 2010): *Integrative assessment of an estuarine system: hydrodynamical, chemical and ecotoxicological approach. An example in Pasaia Harbour (Northeastern Spain).*

- Presentación de resultados en el 15th International Conference on Heavy Metals in the Environment (Gdansk, septiembre 2010): *Application of passive samplers for labile metal fraction evaluation in estuarine waters: an example from the Bay of Biscay (Northeastern Spain).*

- Preparación y envío de una publicación al Journal of Marine Systems: *Integrative environmental assessment of the impact of Pasaia harbour activities on the Oiartzun estuary (southeastern Bay of Biscay)*. Montero et al. 2011. In press.

- Preparación y envío de una publicación al Marine Pollution Bulletin: *Evaluation of Diffusive Gradients in Thin-Films (DGTs) as a monitoring tool for the assessment of the chemical status of transitional waters within the Water Framework Directive*. Montero et al. 2011 In press

- Preparación y envío de una publicación al Book Series Maralte Books. *Risk Assessment and Environmental Management. Application of DGTs for labile metal fraction evaluation in estuarine waters: an example from the Bay of Biscay (North-eastern Spain)*. Belzunce et al.