



# **EVALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD DE METALES EN SEDIMENTOS ESTUARINOS DE LA RÍA DE HUELVA MEDIANTE MUESTREADORES PASIVOS (DGT)**

Aaron Atuey Méndez Medina

Trabajo entregado para la obtención del grado de **MÁSTER EN TECNOLOGÍA AMBIENTAL**

Modalidad: “Investigación”

Mayo/2022

Directores:

Dr. Carlos Ruiz Cánovas

Dra. María Dolores Basallote Sánchez

## RESUMEN

La intensa actividad minera que se ha dado históricamente en la Faja Pirítica Ibérica (FPI) ha ocasionado el deterioro de las masas de agua, como el estuario de la Ría de Huelva, ubicado en la costa suroeste de España, que recibe aguas fluviales con alta carga de acidez y metales provenientes de los ríos Tinto y Odiel. A medida que estas aguas fluviales de carácter ácido se mezclan con las aguas de mar, de carácter alcalino, se produce la neutralización del pH, y la precipitación y sedimentación de los metales, ocasionando que estos elementos pasen del agua a los sedimentos. Sin embargo, la movilidad y biodisponibilidad de estos metales puede aumentar si se producen cambios físico-químicos en el sedimento. Esta investigación se enfoca en evaluar la disponibilidad de metales (Al, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Pb) en sedimentos estuarinos, ubicados en zona intermareal, empleando muestreadores pasivos (diffusive gradient in thin films, DGT) con dos tiempos de contacto diferentes (12 y 24 h) y compararla con las concentraciones en agua de poro, y extracciones secuenciales parciales (fracción fácilmente intercambiable y asociada a carbonatos) que reflejan las fracciones más lábiles.

Las concentraciones totales de metales en sedimentos y agua de poro (PW) mostraron correlación con la influencia de agua fluvial y el porcentaje de granos finos. En las extracciones secuenciales predominó el porcentaje de metales asociados a carbonatos, presentando el siguiente orden de tendencia BCR > F2 Tessier > F1 Tessier. Especialmente, las mayores concentraciones de fracciones lábiles en DGT de Fe, Mn, Al, Zn, Cd se detectaron en los puntos con mayor influencia fluvial (OS1 y OS2) y en profundidad de los sedimentos. Este incremento en la movilidad de metales en profundidad podría indicar un aumento en los procesos de reducción y redisolución de óxidos de Fe, y en menor medida Mn, que liberarían otros elementos trazas contenidos en estas fases minerales por coprecipitación. Sin embargo, se observó una variabilidad en los resultados respecto de los tiempos de contacto empleados. Es destacable que la concentración de cationes acumulados en los DGTs no aumentó a mayor tiempo de contacto; por el contrario, en numerosos casos se presentó mayor acumulación para 12h de contacto. Esto puede ser debido a procesos de saturación de la resina y competición entre cationes por lo sitios de sorción. Entre los métodos empleados solo se encontró correlación entre DGT y PW para Fe ( $R^2=0,89$  para 12 h y  $R^2=0,82$  para 24 h).

## ABSTRACT

The extensive mining and industrial activity historically developed in the Iberian Pyrite Belt (IPB) has caused the deterioration of water bodies, like La Ría de Huelva estuary, located on the SW coast of Spain, receiving fluvial waters with a high load of acidity and metals coming from the Tinto and Odiel rivers. As these acidic fluvial waters mix with alkaline sea waters, there is a pH neutralization, precipitation, and sedimentation of metals, transferring these elements from the water column to the sediments. However, the mobility and bioavailability of metals are influenced by physicochemical changes. This research focuses on evaluating the availability of metals (Al, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Pb) in intertidal estuarine sediments using diffusive thin films gradient (DGT) with two different contact times (12 and 24 h), and contrast with those detected in sediments, pore water (PW) and labile fractions of sequential extractions (easily exchangeable and carbonates associated fractions).

The total concentrations of metals in sediments and PW showed positive correlation with the influence of fluvial water and the percentage of fine grains. In the sequential extractions, the percentage of metals associated with carbonates predominated, presenting the following order BCR > F2 Tessier > F1 Tessier. Spatially, the highest DGT labile concentrations of Fe, Mn, Al, Zn, Cd were detected in the points with the greatest fluvial influence (OS1 and OS2), and with sediments depth. This increase linked with depth may be related to intense reduction and redissolution of Fe (and to a lesser extent Mn) oxides, which are released back to the porewaters as well other trace elements retained mainly by co-precipitation. However, there was a high variability in the results obtained for each contact time employed, highlighting that the concentration did not increase with the highest contact time, instead in many cases there were greater accumulation with 12 hours of contact time. This may be related to the resin saturation or competitive sorption between cations. Among the methods applied to determine the labile fraction, a correlation between DGT and PW for Fe ( $R^2=0,89$  for 12 h, and  $R^2=0,82$  for 24h) was observed.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco al motor intangible, inmutable e incorruptible por permitirme nacer en una fracción de la existencia humana que la ciencia no es penada y poder participar en esta investigación. Muchas gracias a mi círculo cercano de familiares y amistades que me han acompañado, y que de manera ya sea consciente o inconscientemente han aportado en mi crecimiento tanto personal como profesionalmente.

Un especial agradecimiento a mis tutores por su paciencia y dedicación compartiéndome sus conocimientos y apoyándome con las tareas realizadas tanto en campo como en laboratorio para poder cumplir con los objetivos de la investigación. Así mismo, muchas gracias a todo el equipo de trabajo del laboratorio por hacer calurosa mi visita y experiencia en la Universidad de Huelva.

Por ultimo y no menos importante, muchas gracias a Fundación Carolina por ayudarme a cubrir los gastos tanto para el estudio del master como la movilización a España, y gracias al Ministerio de Economía y Competitividad quien ha financiado este trabajo a través del proyecto TRAMPA (MINECO; PID2020-119196RB-C21).

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1. CONTAMINACIÓN METÁLICA EN AMBIENTES ESTUARINOS .....	1
1.2. MÉTODOS PARA DETERMINAR BIODISPONIBILIDAD DE METALES EN SEDIMENTOS.....	3
1.3. EXTRACCIONES SECUENCIALES DE METALES EN SEDIMENTOS .....	4
1.4. NECESIDAD DE MEJORAR LAS TÉCNICAS DE DETERMINACIÓN DE BIODISPONIBILIDAD Y BIOACCESIBILIDAD: DIFFUSIVE GRADIENT IN THIN FILMS (DGT).....	6
1.4.1. Descripción de la técnica.....	7
1.4.2. Ventajas frente a extracciones secuenciales.....	8
1.5. OBJETIVOS.....	9
1.5.1. Objetivos generales:.....	9
1.5.2. Objetivos específicos:.....	9
<b>2. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>10</b>
2.1. DESCRIPCIÓN DE LA ZONA DE ESTUDIO.....	10
2.2. MUESTREO DE CAMPO .....	12
2.2.1. Muestreo de testigos.....	13
2.2.2. Muestreo pasivo con DGT .....	14
2.3. ESTIMACIÓN DE LA DISPONIBILIDAD DE METALES .....	15
2.3.1. Concentración total de metales en sedimentos estuarinos.....	16
2.3.2. Extracción de metales disueltos en agua de poro .....	17
2.3.3. Digestión ácida de muestreadores pasivos DGT .....	17
2.3.4. Extracciones secuenciales.....	19
<b>3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>21</b>
3.1. GRANULOMETRÍA DE LOS SEDIMENTOS.....	21
3.2. CONCENTRACIÓN DE METALES EN SEDIMENTOS.....	21
3.3. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DEL AGUA DE PORO.....	28
3.4. CONCENTRACIÓN DE METALES EN AGUA DE PORO .....	30
3.5. CONCENTRACIÓN EN EXTRACCIONES SECUENCIALES (FRACCIÓN ÁCIDA EXTRACTABLE, INTERCAMBIABLE Y UNIDA A CARBONATOS) .....	32
3.6. CONCENTRACIÓN DE METALES ACUMULADOS EN DGT .....	40
3.7. COMPARACIÓN DE CONCENTRACIÓN ACUMULADA EN DGT, AGUA DE PORO Y EXTRACCIONES SECUENCIALES.....	45
<b>4. CONCLUSIONES .....</b>	<b>47</b>
<b>5. REFERENCIAS .....</b>	<b>49</b>
<b>6. ANEXOS .....</b>	<b>54</b>

## LISTA DE TABLAS

TABLA 1. PROBLEMAS AMBIENTALES EN ESTUARIOS Y SUS FUENTES.....	1
TABLA 2. DESCRIPCIÓN DE LAS ZONAS HIDROQUÍMICAS DE LA RÍA DE HUELVA. FUENTE: ADAPTADO DE CARRO ET AL., 2019 Y CÁNOVAS ET AL., 2020. ....	11
TABLA 3. VALORES GUÍAS DE CALIDAD DE SEDIMENTOS QUE REFLEJAN CONCENTRACIONES DE EFECTO PROBABLE. TOMADO DE (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2000). ....	21
TABLA 4. RESULTADOS DE BLANCOS EN EXTRACCIONES SECUENCIALES .....	32
TABLA 5. RESULTADOS P-VALOR DE PRUEBAS PARA COMPARACIÓN DE MEDIAS: T DE STUDENT Y WILCOXON .....	44

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. PRINCIPALES VÍAS POTENCIALES DE ENTRADA DE ELEMENTOS TÓXICOS EN EL ECOSISTEMA POR FUENTES NATURALES, ANTRÓPICAS Y POTENCIALES PROCESOS DE BIOACUMULACIÓN. TOMADA DE SIEGEL, 2002. ....	3
FIGURA 2. FRACCIONAMIENTO GEOQUÍMICO DE METALES EN SEDIMENTOS ACUÁTICOS. TOMADA DE RENDINA (2015). ....	6
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DEL ENSAMBLAJE DE DGT. TOMADO DE AMATO ET AL., 2019.....	7
FIGURA 4. UBICACIÓN Y EXTENSIÓN DE LA ZONIFICACIÓN DEL SISTEMA ESTUARINO DEBIDO A VARIACIONES ESTACIONALES. TOMADA DE CARRO ET AL., 2019.....	11
FIGURA 5. MAPA DE UBICACIÓN DE PUNTOS DE MUESTREO .....	12
FIGURA 6. (A) INSERCIÓN DE TUBO PVC PARA COLECTA DE RÉPLICA DE SEDIMENTOS; (B) INSERCIÓN MANUAL DE DGT EN SEDIMENTOS; (C) MUESTREADORES PASIVOS TIPO DGT COLOCADOS EN SEDIMENTOS.....	14
FIGURA 7. HORAS DE UBICACIÓN Y RECOLECCIÓN DE DGT PARA MUESTREO DE 12 Y 24 HORAS .....	15
FIGURA 8. (A) SECCIONADO GRADUAL DE SEDIMENTOS; (B) MUESTRAS DE SEDIMENTOS EN LIOFILIZADOR .....	16
FIGURA 9. (A) SECCIONADO Y EXTRACCIÓN DE RESINA DE CADA DGT; (B) ADICIÓN DE ÁCIDO ACÉTICO 0.11M A SEDIMENTOS .....	18
FIGURA 10. CONCENTRACIÓN FE (A) Y AL (B) EN SEDIMENTOS ESTUARINOS ESTUDIADOS. ....	22
FIGURA 11. CONCENTRACIÓN DE CU (A), ZN (B) Y AS (C) EN LOS SEDIMENTOS ESTUARINOS ESTUDIADOS. ....	24
FIGURA 12. A) CONCENTRACIÓN DE Pb EN SEDIMENTOS ESTUARINOS. B) CONCENTRACIÓN DE Ni EN SEDIMENTOS ESTUARINOS .....	25
FIGURA 13. ANÁLISIS DE COMPONENTES PRINCIPALES DE VARIABLES Y OBSERVACIONES .....	26
FIGURA 14. VALORES DE PH DEL AGUA DE PORO EN LOS DIFERENTES TESTIGOS DE SEDIMENTOS .....	28
FIGURA 15. VALORES DE ORP DEL AGUA DE PORO EN LOS DIFERENTES TESTIGOS DE SEDIMENTOS.....	29
FIGURA 16. VALORES DE CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA DEL AGUA DE PORO EN LOS DIFERENTES TESTIGOS DE SEDIMENTOS.....	29
FIGURA 17. CONCENTRACIONES FE, ZN, MN Y AL EN AGUA DE PORO DE SEDIMENTOS ESTUARINOS ESTUDIADOS.....	30
FIGURA 18. GRÁFICO DE DISPERSIÓN DE ORP Y LOG FE .....	31
FIGURA 19. DIAGRAMAS DE CAJA DE EXTRACCIONES DE Mn EN SEDIMENTOS ESTUARINOS .....	34
FIGURA 20. DIAGRAMAS DE CAJA DE EXTRACCIONES DE Cd EN SEDIMENTOS ESTUARINOS.....	35
FIGURA 21. DIAGRAMAS DE CAJA DE EXTRACCIONES DE Zn EN SEDIMENTOS ESTUARINOS.....	36
FIGURA 22. DIAGRAMAS DE CAJA DE EXTRACCIONES DE Al EN SEDIMENTOS ESTUARINOS .....	37
FIGURA 23. DIAGRAMAS DE CAJA DE EXTRACCIONES DE Cu EN SEDIMENTOS ESTUARINOS.....	38
FIGURA 24. DIAGRAMAS DE CAJA DE EXTRACCIONES DE Pb EN SEDIMENTOS ESTUARINOS.....	39
FIGURA 25. A) CONCENTRACIÓN DE Al; B) CONCENTRACIÓN DE Mn; C) CONCENTRACIÓN DE Fe EN DGT.....	41
FIGURA 26. A) CONCENTRACIÓN DE Cu; B) CONCENTRACIÓN DE Zn EN DGT .....	42
FIGURA 27. A) CONCENTRACIÓN DE Cd; B) CONCENTRACIÓN DE As; C) CONCENTRACIÓN DE Pb EN DGT.....	43
FIGURA 28. RELACIÓN LINEAL DE LA CONCENTRACIÓN DE Fe EN AGUA DE PORO (PW) Y ACUMULACIÓN EN DGT.....	45

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Contaminación metálica en ambientes estuarinos

Un estuario se define como “un cuerpo de agua parcialmente encerrado que se forma cuando las aguas dulces provenientes de ríos y quebradas fluyen hacia el océano y se mezclan con el agua salada del mar” (US EPA, 2016a). Estos cuerpos de agua son considerados áreas amenazadas debido a la presión causada por el aumento de las actividades antropogénicas. Por ejemplo, los estuarios son zonas que han experimentado un incremento de la urbanización y consecuentemente en la descarga de efluentes domésticos e industriales (Cánovas, et al., 2020). La US EPA (2016b) menciona que de manera generalizada los estuarios enfrentan problemas ambientales y retos similares que se resumen en la Tabla 1.

**Tabla 1. Problemas ambientales en estuarios y sus fuentes.**

Problema	Fuentes
Sobrecarga de nutrientes	Descargas de aguas residuales, escorrentías de agricultura, sedimentos, deposición atmosférica etc.
Patógenos	Aguas de escorrentías urbanas y agrícolas, residuos, mal manejo de pozos sépticos, etc.
Sustancias químicas tóxicas	Aguas pluviales contaminadas, vertidos industriales, escorrentías de aguas agrícolas, deposición atmosférica, sedimentos.
Pérdida y degradación de hábitats	Cambios de uso de suelo, dragado de sedimentos, urbanización, canalizaciones.
Introducción de especies	Lastre de navíos, cultivo en el mar, comercio de acuarios.
Alteración al régimen natural del flujo	Alteración del régimen natural del flujo de los tributarios.
Reducción de peces y vida silvestre	Plaguicidas, derrames de hidrocarburos, bioacumulación de toxinas, brotes de enfermedades, florecimiento de algas, sobrepesca, deforestación, etc.

Fuente: Adaptado de (US EPA, 2016b).

Cabe destacar que dentro de las sustancias tóxicas emitidas al medio ambiente, se ha observado un aumento en la concentración de diversos elementos trazas, debido a la creciente demanda de los metales que son utilizados para la fabricación de tecnología y por los sistemas de ingeniería (Cánovas et al., 2020). Por ende, la contaminación metálica de ambientes estuarinos está fuertemente controlada por el aporte de aguas fluviales enriquecidas en metales, la descarga directa de efluentes industriales y otras fuentes como las actividades de mantenimiento de embarcaciones marítimas, entre ellas el uso de pinturas antiincrustantes enriquecidas en metales.

El estuario de la Ría de Huelva, formado por la confluencia de los ríos Tinto y Odiel, supone un ejemplo de contaminación por metales. Las cuencas de los ríos Tinto y Odiel se han visto afectadas históricamente por el desarrollo de actividades mineras desde épocas pre-romanas, que han causado la degradación ambiental de sus aguas, dando lugar a que estos ríos transporten altas cargas de acidez (valores de pH alrededor de 2,5 y 3,5) y metales disueltos hacia el estuario. La mezcla de agua fluvial y agua de mar que se produce en el estuario, genera drásticos cambios de pH y salinidad que ocasionan que algunos de estos metales y metaloides transportados de forma disuelta precipiten y acaben depositándose en los sedimentos del estuario (Cánovas et al., 2020).

Sin embargo, los sedimentos pueden no ser el destino final de los metales depositados ya que pueden ser resuspendidos o redisueltos en el agua intersticial, siendo liberados en el agua suprayacente debido al gradiente de concentración en la interfaz sedimento-agua (Gao et al., 2021). En estos ambientes, la solubilidad, movilización, precipitación y deposición de los metales potencialmente tóxicos depende de factores como el pH, potencial redox, temperatura, textura, composición de la matriz, contenido de materia orgánica y actividad de la biota (Siegel, 2002). Por esta razón, la toxicidad de los metales no suele correlacionarse directamente con su concentración total en el sedimento sino con su biodisponibilidad. En este sentido, la biodisponibilidad se puede definir como “el grado en el que las sustancias químicas presentes en el suelo pueden ser absorbidas o metabolizadas por un receptor humano o ecológico o bien están disponibles para la interacción con los sistemas biológicos (ISO, 2015)”.

Cuando un metal entra en la cadena trófica, los organismos pueden reaccionar de diferentes maneras y puede producirse la bioacumulación y biomagnificación de este. Ambas vías pueden resultar en el alcance de niveles tóxicos a lo largo de la red trófica. Algunos de los efectos asociados a concentraciones tóxicas de estos elementos pueden evidenciarse por el malfuncionamiento fisiológico de los organismos (Siegel, 2002). Por ejemplo, se ha observado que los metales presentes en sedimentos pueden tener efectos adversos en la supervivencia, crecimiento y reproducción de los organismos bentónicos (Gao et al., 2021).



Asimismo, el proceso de biomagnificación puede alcanzar al ser humano, ocasionando efectos adversos en la salud, que a su vez estarán determinados por la concentración, tipo y especie química del metal en cuestión. En la Figura 1 se ilustra mediante un mapa conceptual las principales vías naturales y antrópicas por las cuales los metales pueden afectar al ser humano. Se aprecia que, de manera natural, el origen puede darse a través de la meteorización de rocas o bien por vulcanismo y de manera antrópica puede ser causado por efluentes contaminados o emisiones. Una vez que los metales están disponibles en el ecosistema, estos pueden incorporarse al suelo y/o cuerpos de agua y posteriormente entrar en la cadena trófica hasta alcanzar el ser humano.

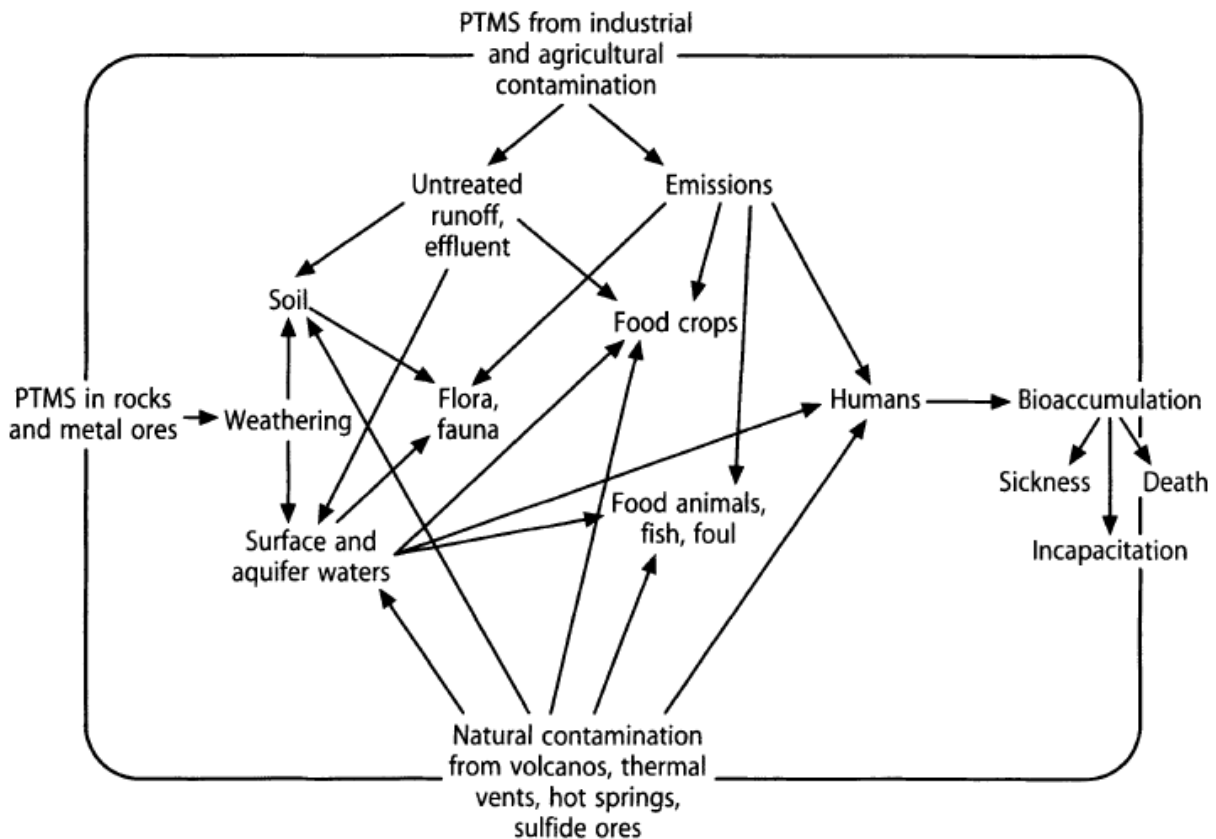


Figura 1. Principales vías potenciales de entrada de elementos tóxicos en el ecosistema por fuentes naturales, antrópicas y potenciales procesos de bioacumulación. Tomada de Siegel, 2002.

## 1.2. Métodos para determinar biodisponibilidad de metales en sedimentos

Dentro de los métodos más comunes para determinar la biodisponibilidad de metales en sedimentos encontramos aquellos enfocados en la extracción química de los elementos, como es el caso de las extracciones secuenciales (e.g., Tokalioglu et al., 2000; Valero et al., 2020; Rosado et al., 2015), los ensayos de toxicidad (e.g., Pascual et al., 2019) o la cuantificación de elementos disueltos en el agua intersticial (Berry et al., 1996).

Las extracciones secuenciales constituyen una aproximación geoquímica y ambiental para comprender el comportamiento químico y la disponibilidad de los metales en el sedimento. Los datos sobre la movilidad y biodisponibilidad potencial de los elementos obtenidos con estos procedimientos secuenciales resultan muy útiles en la estimación de riesgos ecológicos (Quevedo et al., 2012).

Un análisis de la composición del agua intersticial puede proporcionar información sobre la biodisponibilidad de metales para organismos en contacto con esa agua. En este sentido, Burkhard (2016) menciona que la biodisponibilidad y la toxicidad de los elementos son proporcionales a la concentración en el agua intersticial, dado que la concentración en el agua intersticial se corresponde estrechamente con la actividad química del contaminante. Esto ha sido corroborado por diversos estudios donde se mantuvieron concentraciones constantes de cadmio en el agua intersticial de sedimentos enriquecidos con diferentes cantidades de carbono orgánico, encontrando que la mortalidad de los organismos expuestos (el anfípodo *Ampelisca abdita*) estuvo relacionada con la concentración de metal en el agua intersticial pero no con la concentración total en sedimentos (Berry et al., 1996; Kemp & Swartz 1998).

Además, existen algunas técnicas que miden selectivamente la fracción de metales potencialmente tóxicos incluyendo entre ellas, las matrices voltamperométricas de microelectrodos integrados en gel, cronopotenciometría, electrodos selectivos de iones y gradiente difusivo en películas delgadas (DGT por sus siglas en inglés; Diffusive Gradient in Thin films) (Paller et al., 2019).

### **1.3. Extracciones secuenciales de metales en sedimentos**

La importancia de las extracciones secuenciales radica en que la concentración total de metales y metaloides presentes en sedimentos no es directamente proporcional a los efectos tóxicos en los organismos acuáticos. Debido a que los elementos trazas se distribuyen en los diferentes compartimentos del suelo con una reactividad muy diferente; por ejemplo, elementos que están superficialmente adsorbidos o complejados con arcillas minerales, óxidos de Fe y Mn o materia orgánica son más intercambiables con la solución del suelo (fase disuelta) que cuando estos elementos están ocluidos dentro de los sólidos del suelo o bien estructuralmente incorporados en los minerales del suelo (Hooda, 2010). Por consiguiente, variaciones en las condiciones ambientales tales como acidez, potencial redox, concentración de ligandos orgánicos e inorgánicos puede resultar en cambios en la movilidad de estos elementos (Silveti Loeza et al., 2013).

Dentro del uso de técnicas para determinar el fraccionamiento de un metal en muestras de sedimentos, el uso de extracciones secuenciales, aunque consumen mayor cantidad de tiempo, provee información acerca del origen, modo de ocurrencia, disponibilidad biológica y fisicoquímica, movilización y transporte (Tokalioglu et al., 2000). Por esta razón, los programas ambientales enfocados en la evaluación de la movilidad y biodisponibilidad de elementos potencialmente tóxicos en matrices suelo/sedimento suelen incorporar dentro de sus herramientas estos métodos de extracción selectiva (Siegel, 2002). El principal objetivo de estas extracciones es disolver selectivamente los metales asociados a las distintas fases geoquímicas del sedimento (e.g., intercambiable, asociada a carbonatos, reducible, oxidable y residual) proporcionando información sobre su movilidad en el sedimento (Tokalioglu et al., 2000). Entre los métodos de extracción secuencial más utilizados se encuentran el propuesto por la Comisión Europea, conocida como extracción secuencial en tres etapas (European Community Bureau of Reference, BCR) y la extracción propuesta por Tessier (Silveti Loeza et al., 2013; Delgado Morales, 2018).

El método propuesto por Tessier, considera la extracción de 5 diferentes fracciones: intercambiable, carbonatada, asociada a óxidos de hierro y manganeso (fracción reducible), unida a materia orgánica y reducida (fracción oxidable), y residual. En cambio, el método BCR estandariza 3 etapas y recomienda realizar una cuarta, conocida como fracción residual. Este método une las dos primeras fracciones del método de Tessier de tal forma que extrae la fracción intercambiable y la carbonatada en una misma etapa (Delgado Morales, 2018). Cabe destacar que la disponibilidad de los metales decrece progresivamente con el uso de los extractantes, siendo la primera fracción (intercambiable), la que tiene mayor facilidad de liberar los elementos. La Figura 2 resume mediante un mapa conceptual la distribución de metales en las diferentes fracciones geoquímicas en sedimentos acuáticos. Se aprecia que los metales (Me) disueltos e intercambiables son considerados los más disponibles para los organismos. A continuación, los Me unidos a carbonatos, adsorbidos en óxidos de Fe/Mn, asociados a MO o formando parte de sulfuros son potencialmente biodisponibles. Y los que forman parte de las estructuras cristalinas de las arcillas y minerales primarios no estarían biodisponibles.

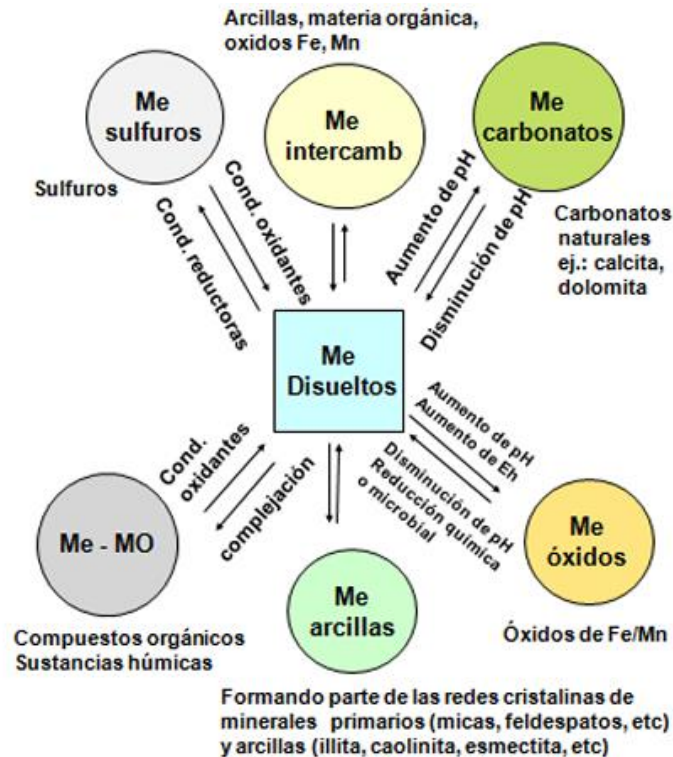


Figura 2. Fraccionamiento geoquímico de metales en sedimentos acuáticos. Tomada de Rendina (2015).

No obstante, las extracciones secuenciales también cuentan con algunas limitaciones, como es el hecho de que son procedimientos estáticos y no pueden brindar información completa sobre la movilidad de los metales bajo condiciones dinámicas de los sedimentos (Gao et al., 2021), así como la falta de selectividad de los extractantes (Caraballo et al., 2018). Es por esta razón que, para la medición de biodisponibilidad, usualmente son preferidos los ensayos de toxicidad sobre los ensayos químicos tradicionales porque estos brindan una medida directa de la respuesta biológica y bioacumulación.

#### 1.4. Necesidad de mejorar las técnicas de determinación de biodisponibilidad y bioaccesibilidad: Diffusive Gradient in Thin films (DGT)

A pesar de que con las extracciones secuenciales se puede obtener información valiosa sobre la movilidad de los metales en las fracciones geoquímicas presentes en el sedimento, este método puede presentar algunas limitaciones como, por ejemplo, que la predicción de los efectos tóxicos puede ser sobreestimada. Por lo que, discriminar la fracción lábil de los metales en el sedimento es crucial para la predicción precisa de la toxicidad potencial (Gao et al., 2021). Dentro de las opciones para mejorar la detección de fracciones lábiles se presentan los muestreadores pasivos tipo DGT.

#### 1.4.1. Descripción de la técnica

Los DGT son dispositivos simples y robustos que permite acumular una amplia variedad de sustancias disueltas en contacto con su superficie. Las sustancias cuantificadas dependen de la fase receptora utilizada (incluye cationes metálicos, metaloides, aniones y compuestos orgánicos). Para la determinación de cationes, Chelex es el agente aglutinante más utilizado. Los DGT utilizan la primera ley de difusión de Fick para correlacionar la cantidad de sustancia acumulada con su concentración acuosa (Amato et al., 2019).

Los dispositivos Chelex DGT, consisten en una membrana filtrante, un gel difusivo y una resina (Figura 3), que permiten que las fracciones lábiles como iones y especies inorgánicas presentes en el agua intersticial y los débilmente asociados a partículas y coloides, se transporten por difusión a través del gel y se inmovilicen en el dispositivo (Gao et al., 2021).

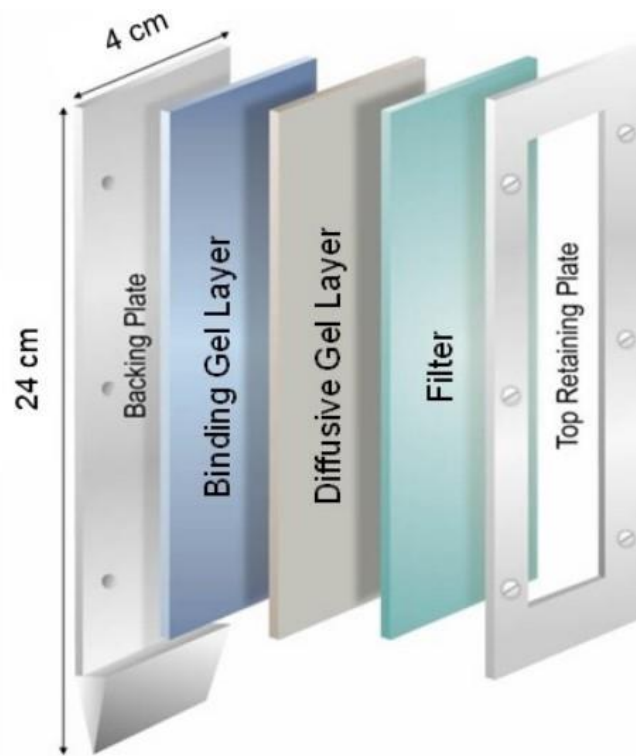


Figura 3. Representación esquemática del ensamblaje de DGT. Tomado de Amato et al., 2019.

Estos dispositivos están cobrando una especial relevancia en la monitorización ambiental y estudios de biodisponibilidad en sistemas acuáticos. Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Ruello et al. (2008) en una zona industrial contaminada con metales, donde se encontró mayores concentraciones de metales en el agua intersticial de sedimentos que en sus equivalentes mediciones con DGT. Estas diferencias se atribuyen a la presencia de metales en forma coloidal, que son excluidos por los DGT y análogamente tampoco serían ingeridos directamente por los organismos acuáticos (Ruello et al., 2008). Así mismo, Paller et al. (2019) estudiaron la biodisponibilidad de Cu en aguas con una elevada concentración de ácidos húmicos mediante DGT. Estos autores indicaron que los DGT excluyeron el Cu no biodisponible y no tóxico asociado a carbono orgánico disuelto (DOC); por consiguiente, los DGT proveen una mejor estimación de la biodisponibilidad y toxicidad.

No obstante, es importante tener en cuenta que la técnica DGT también presenta sus limitaciones por lo que no puede ser considerada como una solución única para los análisis de riesgo. Por ende, la combinación de esta técnica (DGT) con otras metodologías para la determinación de la biodisponibilidad es útil para realizar evaluaciones más precisas (Valero et al., 2020; Gao et al., 2021; Yuan et al., 2020).

#### 1.4.2. Ventajas frente a extracciones secuenciales

Una de las desventajas de las extracciones secuenciales es que la determinación de la biodisponibilidad se ve limitada en ambientes con alta variabilidad fisicoquímica, como es el caso de los sedimentos estuarinos donde las características físico-químicas se ven altamente influenciadas por la mezcla de aguas fluviales ácidas con agua salina. En estos ambientes, el uso de los DGT representa una alternativa idónea debido a que esta tecnología permite medir la concentración integrada en el tiempo de contaminantes a través de un gradiente difusivo en resinas. Así lo confirma Gao et al. (2021) quienes mencionan que esta tecnología ha sido satisfactoriamente aplicada para investigar los ciclos geoquímicos de los metales en sedimentos.

Otra ventaja de los DGT frente a las extracciones secuenciales radica en que, como se ha mencionado en estudios previos, las extracciones secuenciales pueden sobreestimar la toxicidad de los sedimentos. En cambio, Xie et al. (2021) mencionan que múltiples estudios han observado que las concentraciones crecientes de metales lábiles se correlacionan con una bioacumulación creciente, y que los umbrales de efectos tóxicos basados en mediciones de flujo de metal inducidas por DGT proporcionan mejores predicciones de riesgo que las concentraciones totales de metales en sedimentos u otras medidas de extracción en fase sólida.

Por otro lado, la evaluación de la biodisponibilidad en sedimentos representa un desafío para todas las técnicas debido a su inherente heterogeneidad y estratificación impulsada por las condiciones redox. En este sentido, otra de las ventajas de los DGT frente a técnicas convencionales es que proporciona mediciones en sedimentos en diferentes ubicaciones y en dos dimensiones del espacio (Zhang & Davison, 2015). Así también lo confirman Valero et al. (2020) quienes mencionan que la tecnología DGT permite acumular, cuantitativa y simultáneamente, especies lábiles de metales en sedimentos con una alta resolución espacial.

## **1.5. Objetivos**

El objetivo principal de este estudio es evaluar la biodisponibilidad de metales en sedimentos estuarinos mediante la cuantificación de fracciones lábiles de metales mediante muestreadores pasivos tipo DGT y compararlo con otros métodos de determinación, como son la cuantificación de elementos trazas en agua de poro y en fracción intercambiable y carbonatada de sedimentos. Por tanto, los objetivos generales del estudio son:

### 1.5.1. Objetivos generales:

- Evaluar biodisponibilidad de metales en sedimentos estuarinos de la Ría de Huelva mediante muestreadores pasivos (DGT).
- Comparar la biodisponibilidad de los metales determinada mediante los muestreadores pasivos (DGT) con elementos trazas presentes en agua de poro y extracciones secuenciales de sedimentos.

### 1.5.2. Objetivos específicos:

Para la consecución de los objetivos generales se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Cuantificar las concentraciones totales de metales en sedimentos estuarinos.
- Cuantificar las concentraciones de metales disueltos en el agua de poro presente en los sedimentos estuarinos.
- Cuantificar las concentraciones lábiles de metales acumulados en DGT mediante exposición directa durante 12 y 24 horas de contacto con sedimentos.
- Cuantificar las concentraciones de metales presentes dentro de las fracciones intercambiables (F1) y carbonatadas (F2) en los sedimentos, mediante los métodos de extracción BCR y Tessier.
- Identificar variabilidad en la biodisponibilidad de los metales en función de la profundidad y condiciones fisicoquímicas de los sedimentos.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Descripción de la zona de estudio

La zona de estudio se inserta dentro del sistema estuarino llamado “Ría de Huelva” que se ubica en el suroeste de la península ibérica y donde desembocan los ríos Tinto y Odiel. El estuario tiene una extensión de 15 km y en función de su dinámica sedimentaria puede dividirse en cuatro sectores: Canal del Padre Santo, Subsistema Punta Umbría, Estuario del Río Odiel y Estuario del Río Tinto (Carro et al., 2019). El área específica de estudio comprende la zona del estuario del río Odiel y el canal del Padre Santo.

El canal del Padre Santo se caracteriza por la mayor influencia del agua mareal y el canal constituye la principal vía de navegación por la que tiene lugar el tránsito desde el mar hacia el Puerto de Huelva. En su margen derecha se encuentran situadas buena parte de las instalaciones portuarias y un importante polígono de industrias químicas y básicas (López González et al., 2014). En el estuario del Río Odiel se reciben las descargas directas del Río Odiel y se sitúa la zona de mezcla fluvio-marina de dicho río. En su parte más interna, se desarrollan amplias marismas situadas sobre un complejo sistema de islas separadas por canales mareales distribuidores que forman parte del Paraje Natural Marismas del Odiel. Cerca de la confluencia de este sector con el Canal del Padre Santo están situadas el resto de las instalaciones portuarias y un segundo polígono industrial (López González et al., 2014).

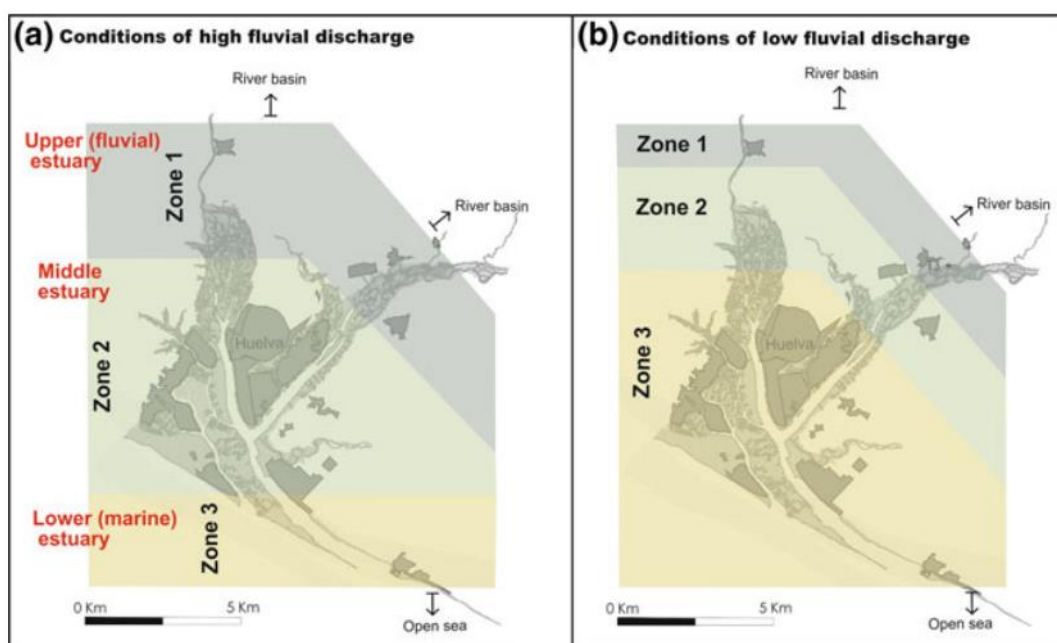
Como consecuencia de la intensa actividad minera que se ha dado a lo largo de la Faja Pirítica Ibérica (FPI), tanto el río Odiel como el río Tinto, reciben el vertido de drenajes ácidos de minas (AMD) ocasionando que previamente a su desembocadura en la Ría de Huelva las aguas de ambos ríos presenten bajos valores de pH (valores medios de 2,8 para río Tinto y 3,6 para el río Odiel), alta concentración de sulfatos y metales disueltos (Cánovas et al., 2020).

Los procesos de mezcla entre el volumen de agua ácida de los ríos y el agua de mar controlan las propiedades hidroquímicas del estuario, especialmente el comportamiento de los metales y nutrientes. A partir de estas características hidroquímicas se pueden clasificar tres diferentes zonas en la Ría de Huelva según el pH, clorinidad del agua y concentración de metales tanto en fase disuelta como particulada (Tabla 2). Cabe destacar que estas tres zonas se mueven a lo largo del estuario durante el año hidrológico (Figura 4) debido a los cambios en la proporción de agua de río y de mar (Carro et al., 2019).



**Tabla 2. Descripción de las zonas hidroquímicas de la Ría de Huelva. Fuente: Adaptado de Carro et al., 2019 y Cánovas et al., 2020.**

Zona	1	2	3
Valor de pH	2.5 a 4.5	4.5 a 7.5	7.5 a 8.2
Clorinidad (g/L)	<3	3 a 15	>15
Descripción	Neutralización de la acidez y se da precipitación de fases minerales de Fe. Alta proporción de metales son transferidos al material particulado.	Intensa neutralización y dilución de agua proveniente de zona 1 con agua salina, con predominancia de precipitación de minerales de aluminio.	Procesos típicos de mezcla inducidos por la sal. Presencia de metales disueltos limitada a aquellos con comportamiento cuasi conservativos (Zn y Cd) y otros que sufren redisolución o desorción del material particulado (Cu, U y As).



**Figura 4. Ubicación y extensión de la zonificación del sistema estuarino debido a variaciones estacionales. Tomada de Carro et al., 2019.**

Como resultado de esta contaminación, los sedimentos de la Ría de Huelva muestran concentraciones muy altas de metales y metaloides. De acuerdo con López González et al. (2014) se encuentran valores medios de 928 ppm de Cu, 1146 ppm de Zn y 730 ppm de Pb, donde estas concentraciones elevadas de metales no solo se observan en los niveles más superficiales, sino en capas de sedimentos que en algunos puntos se extienden hasta una profundidad de 70 cm, pudiendo afectar a todo el horizonte de colonización de la infauna.

## 2.2. Muestreo de campo

Los puntos de muestreo se seleccionaron de manera que se representase el gradiente hidroquímico, desde el inicio del estuario del río Odiel hasta la desembocadura en la zona del canal del Padre Santo, empleando la herramienta Google Earth. Una vez seleccionados los puntos de muestreo, se realizó una visita física a los puntos preliminares para evaluar el acceso al sitio, tiempos de desplazamiento, afluencia poblacional en el área circundante e influencia puntual de la marea. En la Figura 5 se representa la ubicación final de los puntos de muestreo: **OS1, OS2, OS3, OS4 y OS5** y en el anexo 1 se incluye un apéndice fotográfico de los puntos muestreados.

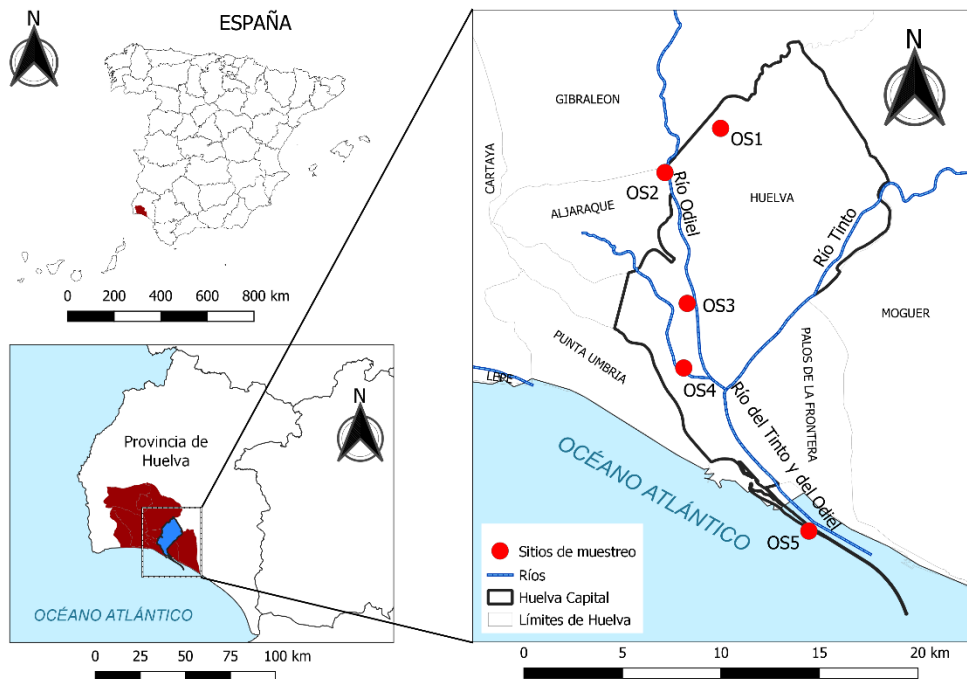


Figura 5. Mapa de ubicación de puntos de muestreo

Iniciando de norte a sur, encontramos el punto OS1, que representa el punto con mayor influencia de aguas fluviales y aledaño al punto de muestreo hay breve presencia poblacional y campos de cultivo. El punto OS2 se ubica en Corrales, en el sector oeste de la parte superior del estuario. También corresponde a una zona con predominante influencia fluvial y se caracteriza por contar con la presencia de antiguas escombreras mineras donde se acumulan residuos ricos en pirita, que debido a procesos de meteorización los contaminantes han sido transferidos hacia los suelos estuarinos (Fernández-Caliani & Grantcharova, 2021).

El punto OS3 se ubica en Marismas del Odiel, un complejo sistema de marismas influenciadas por las mareas. En esta zona se depositan una gran cantidad de sedimentos, hay presencia de una gran variedad de aves que se alimentan y nidifican en el área, con presencia de plantas halófilas (salicornia o espartina), cangrejos y bivalvos. La producción de sal es una de las principales actividades industriales que se da en la zona. El punto OS4 se ubica en Marismas del Burro, en la zona más meridional de las Marismas del Odiel y destaca por presencia de una rica vegetación (tarajes, sabina negra, lentisco, coscoja, almajos, piñero) y también una variada avifauna acuática. Presenta uno los ecosistemas mejor conservados de las marismas (Junta de Andalucía, 2022). Finalmente, el punto OS5 representa la zona con mayor influencia mareal, con una mayor presencia de arenas y abundante presencia de fauna característica de ambientes estuarinos. Se debe destacar que OS5 se encuentra frente a la zona industrial de la ciudad.

El trabajo de campo se divide en dos partes, una parte implica un muestreo de testigos cortos (30 cm) de sedimentos ( $n=2$ ) y la otra parte involucra la colocación de los muestreadores pasivos tipo DGT, que se describe en detalle en el siguiente apartado. Cabe destacar que los testigos cortos se tomaron contiguamente al punto donde se colocaron los dispositivos DGT, con el objetivo de poder hacer una comparación representativa de cada punto de muestreo.

#### 2.2.1. Muestreo de testigos

A continuación, se describe paso a paso el procedimiento empleado para la recogida de testigos:

- a. Se introduce el testigo gradualmente, mediante percusión. En cada punto de muestreo se usó un tubo de PVC (63 mm de diámetro) hueco hasta una profundidad aproximada de 25 cm (Figura 6A).
- b. Alcanzada la profundidad deseada, se registra la variación de profundidad interna y externa del tubo para calcular el porcentaje de compactación de los sedimentos.
- c. Luego, se introduce agua en el espacio anular del tubo de PVC hasta llenar la superficie vacía del tubo y con un tapón de hule se sella el tubo de tal manera que se cree un vacío dentro del mismo.
- d. Se procede a extraer cuidadosamente el tubo, asegurando que no se pierda el vacío durante el proceso.
- e. Extraído completamente el tubo, se coloca papel parafinado en el extremo del tubo donde se encuentran los sedimentos para evitar la difusión de oxígeno.
- f. Luego se rotula y preserva hasta su llegada al laboratorio. Seguidamente, se repite todo el procedimiento para recoger la segunda réplica de sedimentos.



**Figura 6. (A) Inserción de tubo PVC para colecta de réplica de sedimentos; (B) Inserción manual de DGT en sedimentos; (C) Muestreadores pasivos tipo DGT colocados en sedimentos.**

### 2.2.2. Muestreo pasivo con DGT

El muestreo con muestreadores pasivos tipo DGT se realizó durante 12 y 24 horas de exposición con el objetivo de determinar la variabilidad en la bioacumulación de metales según el tiempo de contacto. Por lo que, en cada punto de muestreo se colocaron muestreadores DGT por duplicado, y empleando la *Tabla de mareas 2021* (15 de mayo 2021) (anexo 2) se seleccionó un día que permitiera la colocación y recogida de los DGT con un periodo de diferencia de 12 horas dentro de un mismo día solar.

El día seleccionado para el muestreo fue el día 24 de mayo, iniciando la inserción de los muestreadores pasivos a primera hora de la mañana (Figura 6B y C). Los DGT se trasladaron en bolsas de cierre hermético para prevenir la contaminación cruzada, y empleando guantes de nitrilo se introdujeron de forma manual y verticalmente en los sedimentos.

Una vez iniciado el contacto, se registró el inicio de la hora exacta de contacto. Para la retirada de los DGT, ese mismo día, 12 horas después del inicio de exposición, se retiraron de cada punto el primer lote de DGT registrándose la hora exacta de finalización del contacto. Cada DGT se enjuagó con agua desionizada hasta dejar libre de sólidos la ventana de contacto, se almacenó nuevamente en bolsas de plástico de cierre hermético y se preservaron refrigerados hasta su llegada al laboratorio. Este mismo proceso se repitió para el segundo lote al día siguiente cuando se cumplieron las 24 horas de exposición. En la Figura 7 se puede visualizar la fecha, hora y estado de la marea en las que se dispusieron y retiraron los DGT.

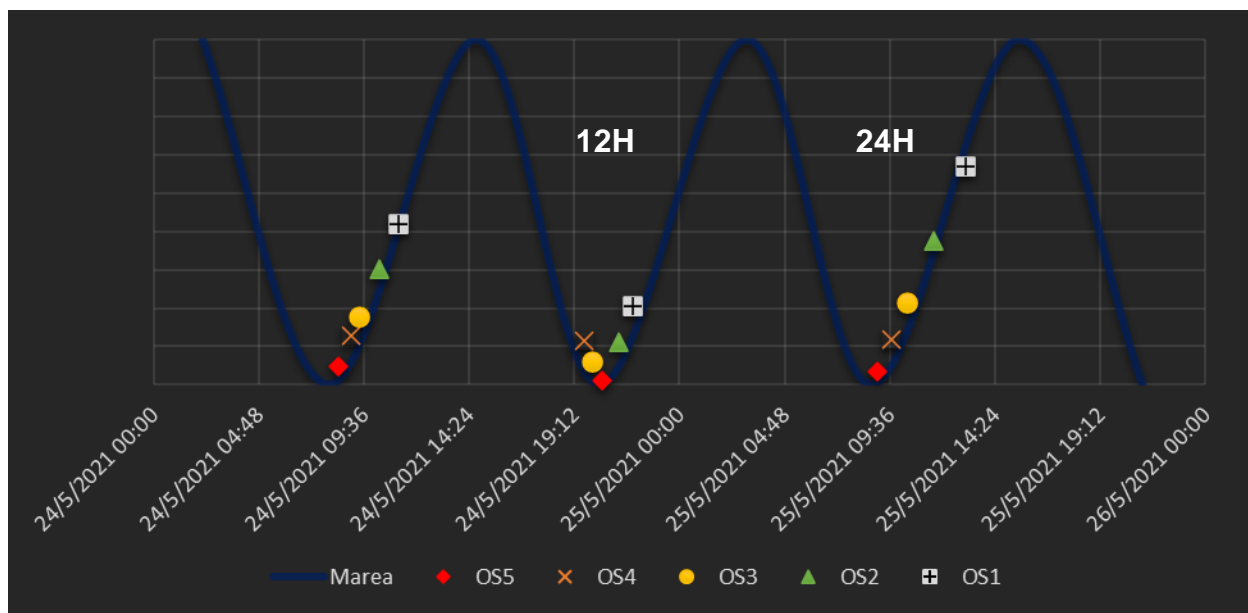


Figura 7. Horas de ubicación y recolección de DGT para muestreo de 12 y 24 horas

### 2.3. Estimación de la disponibilidad de metales

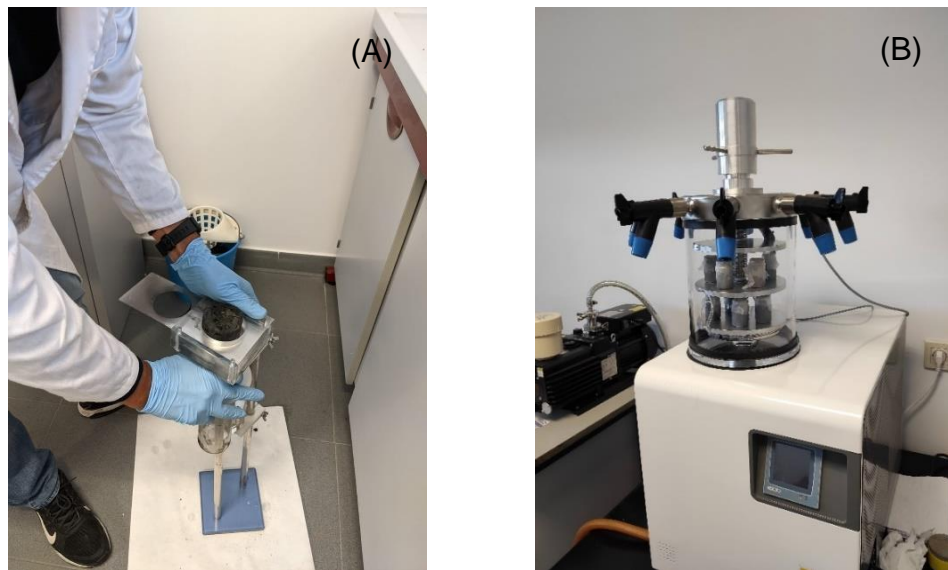
En este estudio se compara la biodisponibilidad de metales mediante la cuantificación de elementos trazas presentes en agua de poro, en la fracción intercambiable y carbonatada de los sedimentos y fracciones lábiles detectadas mediante DGT. A continuación, se detallan los procedimientos para cada uno de estos procedimientos. Esta comparación se realizó a las mismas profundidades de muestreo para todas las matrices: agua intersticial, sedimentos y DGT.

Las réplicas de sedimentos se cortaron de manera exacta empleando un seccionador de sedimentos. Se separaron en secciones de 3 cm hasta alcanzar los 15 cm de profundidad (Figura 8A). De las réplicas recogidas en campo, una se empleó para la extracción de agua de poro o intersticial y la medición de características físico-químicas de sedimentos. La otra replica se utilizó para la determinación de la concentración total y las extracciones secuenciales que se detallan en los siguientes capítulos.

La granulometría de los sedimentos se determinó empleando un equipo Mastersizer, el cual utiliza la técnica de difracción laser para determinar tanto el tamaño de las partículas como su distribución. Esta técnica mide la intensidad de luz dispersada cuando un rayo láser pasa a través de una muestra de partículas dispersas (Malvern Panalytical, 2021).

Los análisis de granulometría se realizan por triplicado por cada muestra de sedimento. A partir de los resultados obtenidos se cuantificó el contenido promedio correspondiente a arcillas ( $<2\ \mu\text{m}$ ), limos ( $2\text{-}50\ \mu\text{m}$ ) y arenas ( $50\text{-}2000\ \mu\text{m}$ ) en cada muestra; y a partir de estos porcentajes se clasificó texturalmente cada muestra (anexo 3) según la clasificación establecida por el Departamento de Agricultura de EEUU (USDA, 1999).

Los sedimentos seleccionados para análisis posteriores se congelaron en frascos plásticos de 30 mL y posteriormente se liofilizaron usando un liofilizador Telstar LyoQuest, a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$  y presión de 0,2 mbar (Figura 8B). Las muestras secas se homogenizaron mediante molido con morteros de porcelana y nuevamente se almacenaron en envases plásticos de 30 mL.



**Figura 8. (A) Seccionado gradual de sedimentos; (B) Muestras de sedimentos en liofilizador**

### 2.3.1. Concentración total de metales en sedimentos estuarinos

Para la cuantificación total de metales se utilizaron los sedimentos previamente liofilizados. Estos fueron digeridos con una mezcla de  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HCl}$  y  $\text{HF}$  en microondas a  $200^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos, y posteriormente llevados hasta sequedad en estufa a  $80^{\circ}\text{C}$  y el residuo sólido fue recuperado con una solución 10% de  $\text{HNO}_3$ . Finalmente, se cuantificaron los elementos mediante Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS).

### 2.3.2. Extracción de metales disueltos en agua de poro

Para la extracción del agua de poro, de cada sección se emplearon  $49,61 \pm 4,85$  g de sedimentos húmedos pesados en una balanza analítica de precisión modelo Kern ADJ. Los sedimentos se centrifugaron (Digicen 20) a 3000 rpm durante 15 minutos en tubos de centrifuga tipo Falcon de 50 mL para la extracción del agua de poro de la fase sólida de los sedimentos. Finalizada la centrifugación, con jeringas de 10 mL se extrajo 1 mL de muestra de cada sección, se filtraron mediante filtros de nylon de  $0,45 \mu\text{m}$  de tamaño de poro y se diluyó en viales de centelleo (dilución 1:10) con agua desionizada.

Las muestras se acidularon al 1% con ácido nítrico Suprapur (65%) y los análisis se realizaron mediante Espectrometría de Masas con Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-MS). El volumen residual de agua de poro se utilizó para la medición de parámetros fisicoquímicos: pH, ORP, temperatura, conductividad eléctrica con una sonda multiparamétrica Crison Sension+ MM150. Cabe destacar, que del punto OS5 solo se pudo extraer agua de poro de la sección más superficial (0-3 cm) debido al alto porcentaje de arenas en este punto de muestreo.

### 2.3.3. Digestión ácida de muestreadores pasivos DGT

A continuación, se describe el procedimiento empleado para la digestión ácida de los DGT. Como protocolo de limpieza, por cada DGT se utilizó un papel y una bolsa plástica nueva como superficie para realizar las tareas pertinentes y entre cada DGT se descontaminaron los utensilios comunes empleando una solución ácida de ácido nítrico al 10% y agua desionizada.

- a. Primero se retira la placa de retención superior del DGT, dejando expuesta la ventana de contacto.
- b. A continuación, se divide la ventana de contacto (15 cm) en cinco (5) secciones, es decir, empleando un cuchillo de plástico, se realiza un corte transversal en la ventana de contacto cada tres (3) cm de profundidad.
- c. Una vez seccionada la ventana, manipulando un juego de pinzas se separa la membrana filtrante y el gel difusivo de la capa de resina (Figura 9 (A)).
- d. A continuación, se coloca cada resina en tubos de ensayo desechables de 2 mL de capacidad, previamente rotulados.
- e. Luego, empleando una pipeta, se añade 1 mL de ácido nítrico 1 M a cada tubo de ensayo.
- f. Una vez aciduladas todas las resinas, con ayuda de una agitadora GFL 3018, se agitan todas las muestras durante 24 horas a 60 rpm.



**Figura 9. (A) Seccionado y extracción de resina de cada DGT; (B) Adición de ácido acético 0.11M a sedimentos**

- g. Finalizadas las 24 horas, empleando una micropipeta se extrae nuevamente el ácido y se transfiere a tubos de centrifuga de 15 mL de capacidad debidamente rotulados. Entre cada muestra de ácido extraído se reemplaza la punta de pipeta para evitar la contaminación cruzada.
- h. El extractante (1 M HNO<sub>3</sub>) se diluye en una proporción 1:10.
- i. Igualmente se cuantifica la concentración de metales mediante espectrometría de masas de plasma acoplado inductivamente (ICP-MS).

#### Cuantificación de metales acumulados en DGT

La concentración de cada metal se calcula mediante la primera ley de Fick en la capa difusiva. Por lo cual, la concentración de metal contenido en la solución extractante del DGT se convierte a masa de metal (M) a través de la siguiente ecuación (Gu, 2021):

$$M = \frac{C_e(V_e + V_g)}{f_e}$$

Donde,

- M: Masa de metal (ng)
- C<sub>e</sub>: Concentración de metal detectada en solución de HNO<sub>3</sub> 1M (ng/mL).
- V<sub>e</sub>: Volumen de HNO<sub>3</sub>, añadido al gel de la resina (1mL)
- V<sub>g</sub>: Volumen de resina (usualmente 0.15mL)
- f<sub>e</sub>: factor de dilución (usualmente 0.8)



Luego de haber calculado la masa para cada metal, se procede a calcular la concentración lábil empleando la siguiente ecuación:

$$C_{DGT} = \frac{M * \Delta g}{D * A * t}$$

Donde,

- $C_{DGT}$ : Concentración (ng/mL)
- M: Masa de metal (ng)
- $\Delta g$ : Espesor de capa difusiva (típicamente 0,093cm)
- D: Coeficiente de difusión del metal correspondiente ( $\text{cm}^2/\text{s}$ )
- A: Área ( $\text{cm}^2$ )
- t: tiempo de contacto (s)

#### 2.3.4. Extracciones secuenciales

En este proceso también se utilizaron las muestras de sedimentos liofilizadas. Cabe destacar que las extracciones realizadas fueron parciales, realizando el proceso únicamente para la primera fracción (F1) a través del método BCR y las dos primeras fracciones (F1 y F2) mediante método Tessier, que representan las fracciones más lábiles de esas extracciones. Posteriormente a las respectivas extracciones, las muestras se acidularon al 1% con ácido nítrico Suprapur (65%) para posterior análisis de los cationes metálicos mediante Espectrometría de Masas con Plasma de Acoplado Inductivamente (ICP-MS). Adicionalmente, como parte del control de calidad se analizó un blanco por cada extracción secuencial realizada, empleando los reactivos utilizados para cada una de las extracciones.

Extracción de la Fracción de metales intercambiable y unidos a carbonatos mediante método BCR

Esta primera etapa del método BCR, consistente en la extracción con ácido acético 0,11M, incluye la fracción intercambiable que representa los elementos adsorbidos débilmente; retenidos sobre la superficie sólida mediante una interacción electrostática relativamente débil, así como a los elementos que pueden ser liberados por los procesos de intercambio iónico y a los elementos que pueden ser coprecipitados con carbonatos (Silveti Loeza et al., 2013). Siguiendo el procedimiento empleado por Rosado et al. (2015) la cantidad empleada fue de 1 g de muestra seca por cada sección, que se añadieron en a tubos de centrifuga, debidamente rotulados, de 50 mL de capacidad. Se preparó una solución de ácido acético 0,11M, añadiéndose 40 mL a cada tubo (Figura 9 B) y se dejó en contacto los sedimentos con el ácido durante 16 horas.

Luego del tiempo de contacto, se centrifugó durante 20 minutos a 3000 rpm para separar las fases sólidas/líquida. De la fase líquida, empleando jeringas de 10 mL, se extrajo una alícuota de 20 mL, que posteriormente se filtró con filtro de nylon de 0,45  $\mu\text{m}$  y se transfirió a viales de centelleo.

#### Extracción de Fracción intercambiable de metales mediante método Tessier

En el caso del método Tessier, en esta primera etapa también se extraen los metales adsorbidos débilmente a los sedimentos, pero se excluye la fracción carbonatada. En este caso tomando en cuenta el protocolo empleado por Rosado et al. (2015) se utilizó una solución de cloruro de magnesio ( $\text{MgCl}_2$ ) 1 M a pH 7. La solución se preparó a partir de cloruro de magnesio hexahidratado, marca Fisher, y dicha solución se ajustó con una solución diluida de NaOH debido a que el pH inicial fue 5. Para esta etapa se digirieron 3 g de muestra seca por cada sección con 24 mL de la solución de  $\text{MgCl}_2$  1 M durante una hora. Posteriormente, se repitió el procedimiento previo de extracción de alícuota, que incluye centrifugación (20 min a 3000 rpm), filtración con 0,45  $\mu\text{m}$  y acidulación. Los sedimentos residuales de este proceso se lavaron con 5 mL de agua desionizada para ser utilizados en la siguiente digestión. El lavado de cada muestra se realizó mediante agitación con posterior centrifugación y finalmente empleando pipetas Pasteur se extrajo el agua añadida.

#### Extracción de Fracción de metales unida a carbonatos mediante método Tessier

De acuerdo con López Julián et al. (2002) dado que los minerales carbonatados presentes en suelo y sedimentos son susceptibles a los cambios de pH, los metales asociados la fracción carbonatada (precipitados o coprecipitados con carbonatos) se suelen solubilizar empleando soluciones reactivas con pH ácido. Por lo cual, en el esquema Tessier se utiliza una solución de acetato sódico 1M, a pH 5. Esta solución se preparó a partir de acetato de sodio anhidro, marca PanReac, y se ajustó el pH de la solución añadiendo ácido acético 1M debido a que el pH inicial fue 9,4. Cada muestra resultante de la extracción anterior se puso en contacto con 24 mL de la solución de acetato de sodio 1M durante cinco horas. Finalizado el tiempo de contacto se repitió el proceso de centrifugación filtración y acidulación anteriormente descrito.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1. Granulometría de los sedimentos

Los resultados indican la predominancia de sedimentos franco limosos en los primeros tres puntos de muestreo (OS1, OS2, OS3), exceptuando en los primeros 3 cm del punto OS3 donde se identificó presencia de material franco arenoso (en el anexo 4 se incluye la tabla de resultados de la clasificación textural de sedimentos). De igual manera en el punto OS4 predomina la textura franco limosa exceptuando de los 6-9 cm donde hay presencia de sedimentos limosos, seguido de material franco arenoso en el estrato de 9-12 cm. Finalmente, el punto OS5, debido a su ubicación en zona costera, se caracteriza por tener una textura franco arenosa, excepto a 6-9 cm de profundidad donde hay presencia nuevamente de sedimentos franco limosos.

#### 3.2. Concentración de metales en sedimentos

En anexo 5 se incluye una tabla estadística resumen de los resultados de concentración total de componentes mayoritarios y elementos trazas en los sedimentos estuarinos para cada punto de muestreo. Como estándar de comparación para verificar si las concentraciones detectadas representan un riesgo para la salud humana y el medio ambiente se utilizan las concentraciones de efecto probable (PEC, por sus siglas en inglés), establecidas por la agencia estadounidense de protección ambiental (US EPA), para los principales cationes metálicos en sedimentos (Tabla 3). Los PEC se definen como los valores guías de calidad en sedimentos, son concentraciones por encima de las cuales se espera que ocurran efectos adversos en la biota, y fueron establecidos a partir de estudios sobre toxicidad realizados para determinar los valores guías de calidad en sedimentos (Environmental Protection Agency, 2000).

**Tabla 3. Valores guías de calidad de sedimentos que reflejan concentraciones de efecto probable. Tomado de (Environmental Protection Agency, 2000).**

<b>Metaloides</b>	<b>PEC (mg/kg)</b>
Ni	48,6
Cu	149
Zn	459
As	33
Cd	4,98
Pb	128

PEC: Probable effect concentrations

En la Figura 10 A y B se muestra el gradiente vertical de concentración de Fe y Al en los sedimentos estuarinos de la Ría de Huelva. Fe y Al son los elementos mayoritarios en todos los sedimentos estuarinos. Como patrón general se aprecia que los puntos con mayor influencia fluvial: OS1 y OS2 son los que presentan mayores concentraciones de metales. Por el contrario, en el punto con mayor influencia mareal (OS5) se observa la menor concentración de estos elementos. Este comportamiento se debe a que los puntos con mayor influencia fluvial se encuentran dentro de la zona de precipitación y sedimentación de minerales de Fe y Al debido a la mezcla de agua fluvial y agua de mar (además de procesos de co-precipitación de otros metales y metaloides). Además, los sedimentos ubicados en el punto OS5 se caracterizan por presentar un mayor contenido de arenas.

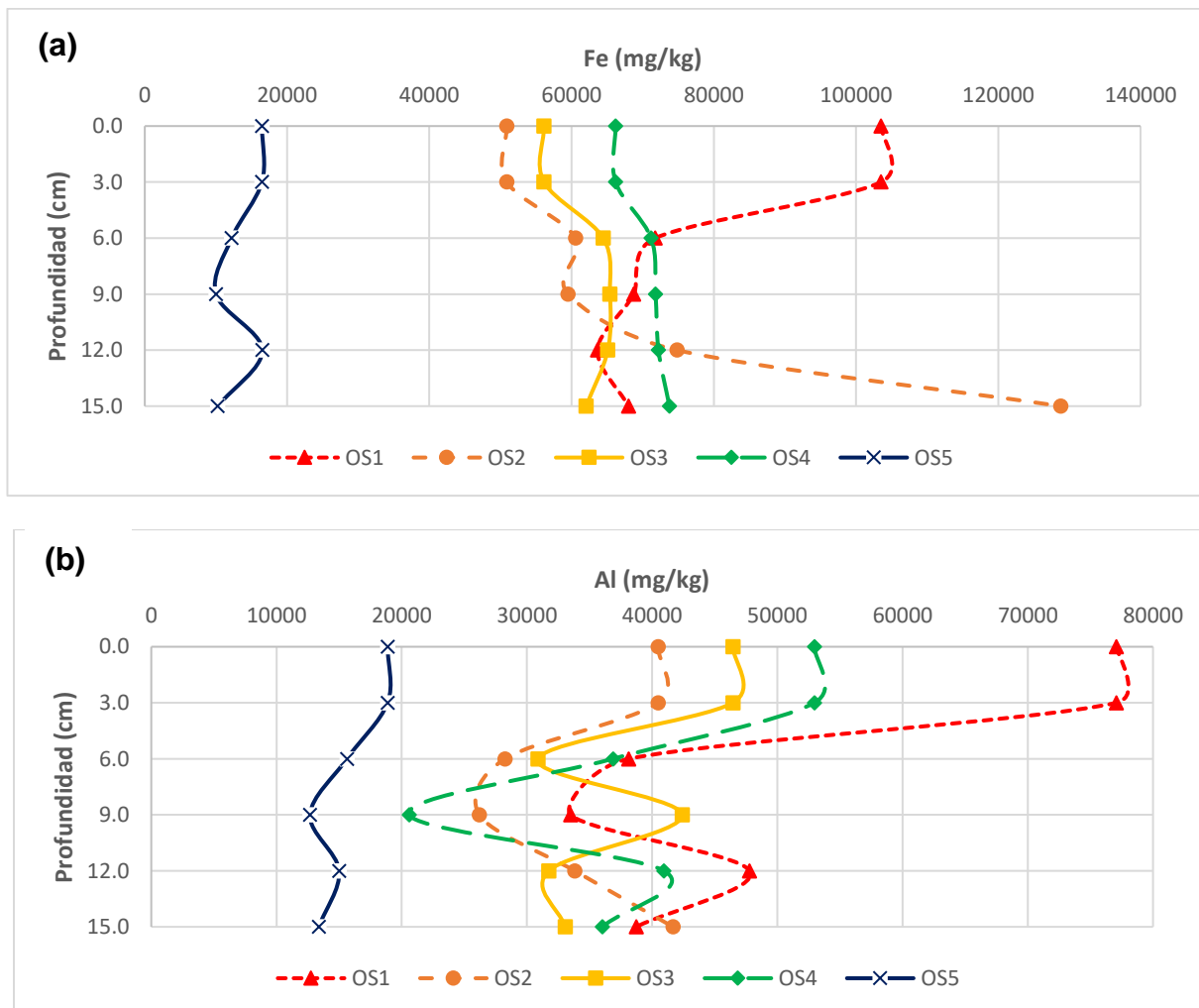


Figura 10. Concentración Fe (A) y Al (B) en sedimentos estuarinos estudiados.

La Figura 11 representa la evolución de la concentración de Cu, Zn y As en los testigos de sedimentos estudiados junto al valor PEC, que indicaría un potencial efecto sobre los seres vivos. Como se aprecia, en el caso del Cu todos los puntos superan el valor de referencia (149 mg/kg), con valores comprendidos entre 286 y 2500 mg/kg en los sedimentos superficiales, y una concentración máxima que alcanza los 3013 mg/kg en los niveles más profundos. En el caso del Zn, los 4 primeros puntos (OS1 a OS4) superan el valor de referencia (459 mg/kg) mientras que en OS5 únicamente a los 12 cm se observan valores superiores. El rango de concentraciones se encuentra entre 269 y 2758 mg/kg, presentándose los valores máximos de Zn en los sedimentos superficiales del punto con mayor influencia fluvial (OS1). En el caso del As todos los puntos superan el valor de referencia (33 mg/kg), exceptuando a profundidades de 6, 9 y 15 cm en el punto OS5. El rango de concentraciones de As varía entre 25 y 1538 mg/kg, observándose las mayores concentraciones de As en los estratos inferiores (12 y 15 cm) del punto OS2.

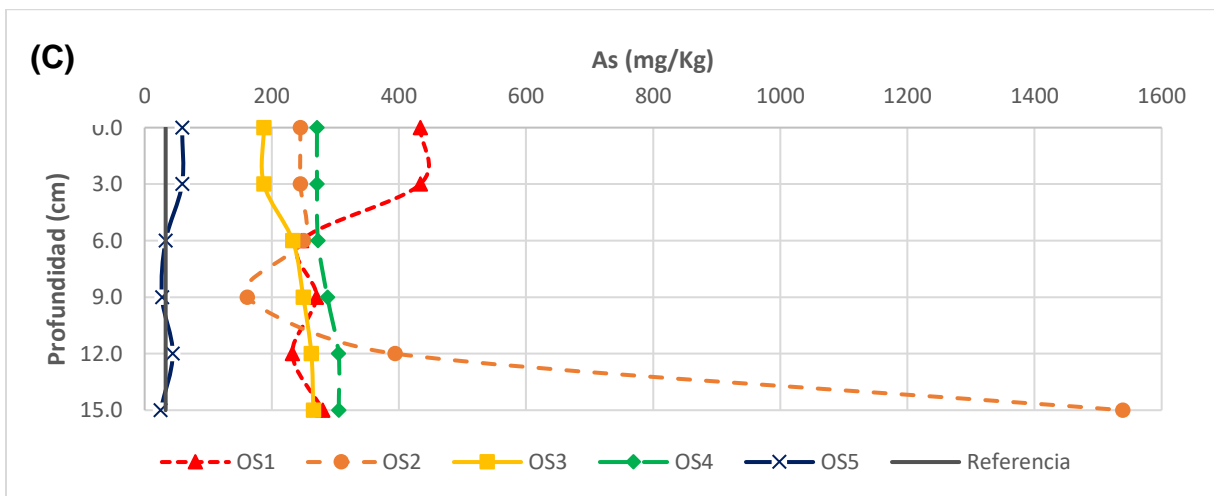
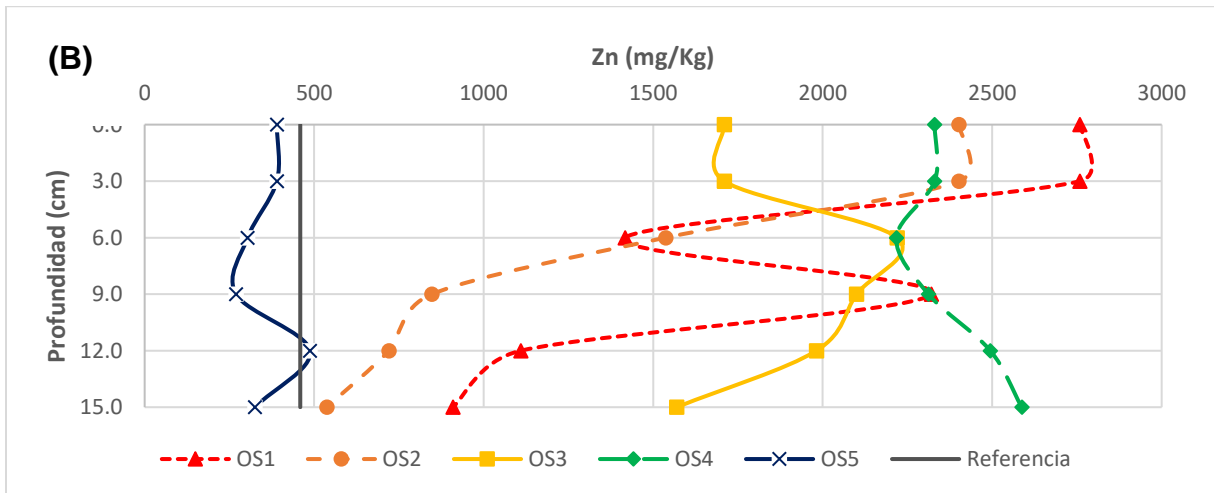
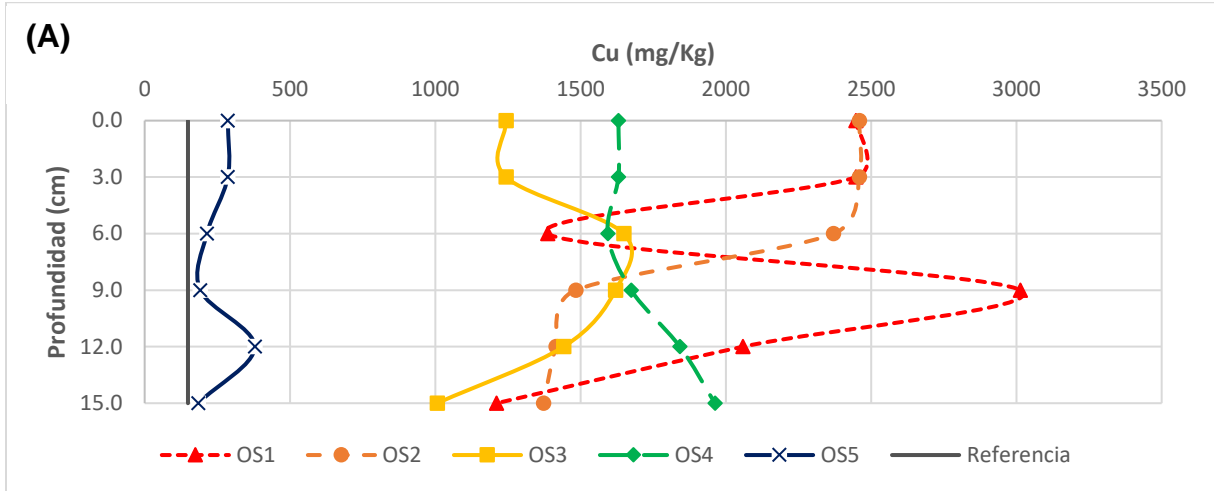
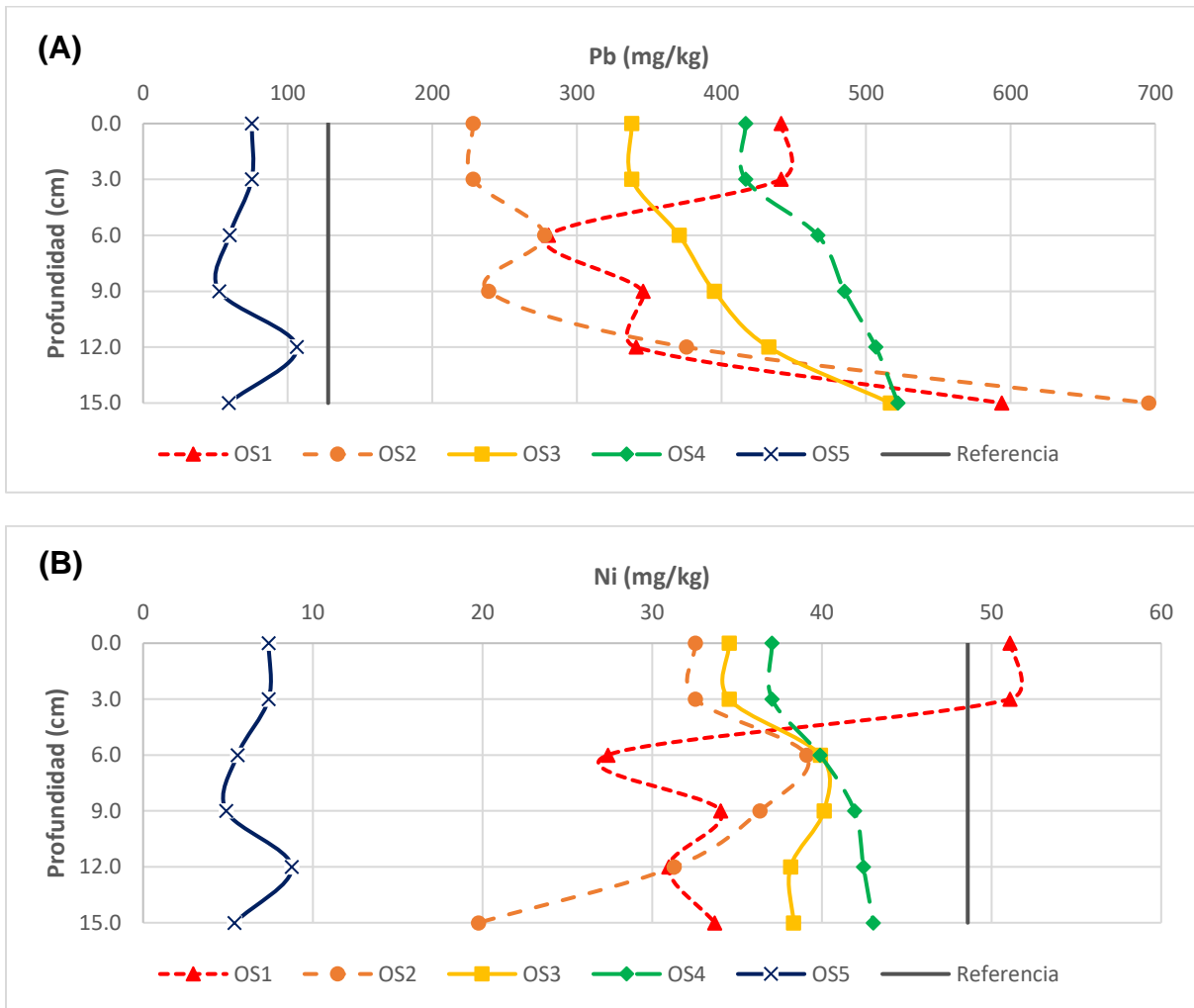


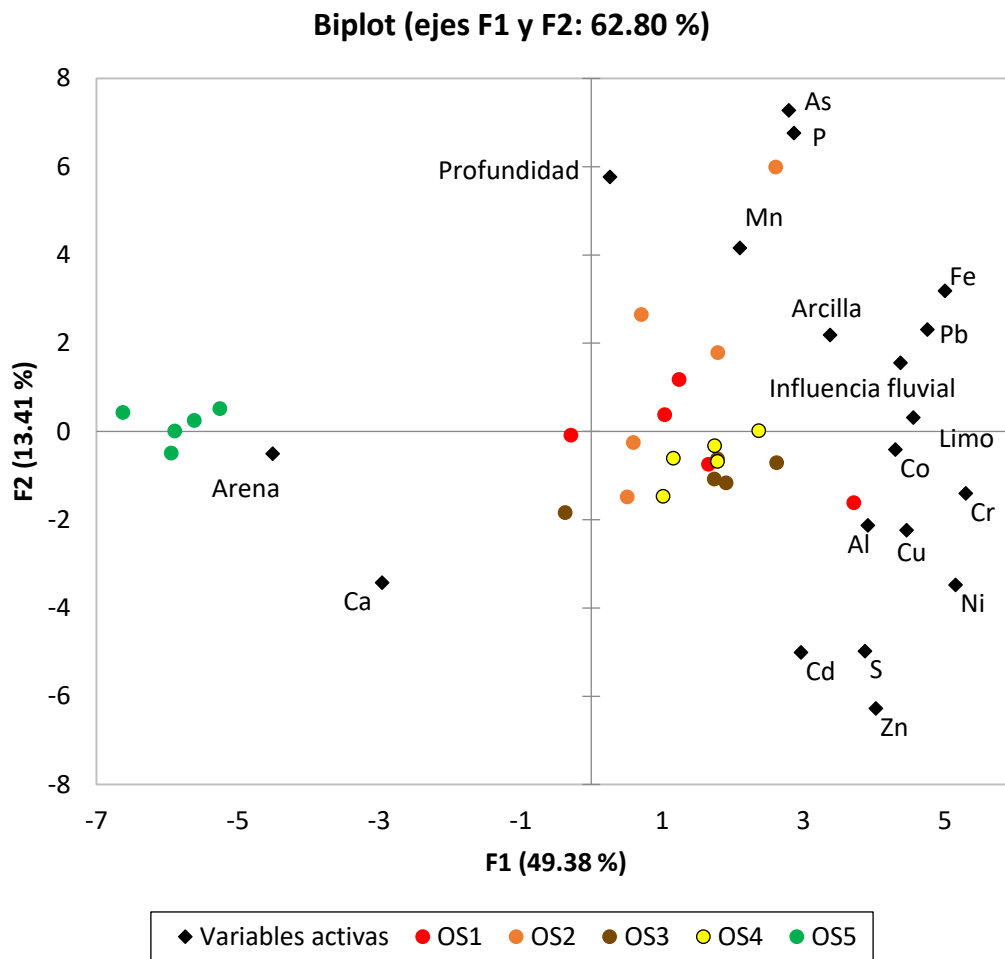
Figura 11. Concentración de Cu (A), Zn (B) y AS (C) en los sedimentos estuarinos estudiados.

En la Figura 12 se representan las concentraciones de Pb y Ni en los testigos de sedimentos estudiados. Con respecto al Pb, únicamente el punto OS5 no superó el valor de referencia (128 mg/Kg) en ninguno de los niveles muestreados. El rango de concentraciones de Pb se encuentra entre 52 y 695 mg/kg, con las mayores concentraciones de Pb observadas en los niveles más profundos (15 cm) de los dos puntos con mayor influencia fluvial (593 mg/kg en OS1 y 695 mg/kg en OS2). En resumen, exceptuando el punto OS5, todos los puntos presentan elevadas concentraciones de metales, tal y como evidencian estudios previos (e.g., Ruiz et al., 1998; Morillo et al., 2002), lo que podría representar un riesgo para los organismos del ecosistema.



**Figura 12. A) Concentración de Pb en sedimentos estuarinos. B) Concentración de Ni en sedimentos estuarinos**

Para todos los puntos de muestreo, utilizando el software estadístico XLStat, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) empleando como variables cuantitativas la separación del mar (km), ilustrada como influencia fluvial, de cada punto muestreado, profundidad (cm) del sedimento, % de arcilla, limo y arena, las concentraciones (ppm) de P, S y metal/lóides (Al, Ca, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Pb) y como variable cualitativa la respectiva clasificación textural de cada muestra.



**Figura 13. Análisis de componentes principales de variables y observaciones**

A partir del gráfico de variables y observaciones (Figura 13) se aprecia que los dos primeros componentes representan el 63% de la variabilidad de los datos. Se identifica que la mayoría de los elementos trazas (e.g., Al, Co, Cu, Cr, Ni, S, Cd, Fe, Pb) presentan correlación positiva tanto con el grado de influencia fluvial como con el incremento del porcentaje de granos finos (limo y arcilla) en los sedimentos, debido a que los granos finos presentan mayor área de superficie de contacto (Gu, 2021).



Recíprocamente, al aumentar el contenido de arenas disminuye el contenido de contaminantes y aumenta la presencia de Ca debido a la influencia del ambiente marítimo en los sedimentos, probablemente asociado a la presencia de carbonatos. De hecho, se puede apreciar que todas las observaciones correspondientes al punto OS5 se aglomeran formando un único grupo que se caracteriza por presentar correlación positiva con el contenido de arena y Ca. Por otro lado, se aprecia que los elementos calcófilos como Cd, Zn, Ni y Cu presentan correlación positiva con S, que debe indicar la formación de sulfuros metálicos, que se forman en condiciones reductoras típicas de este tipo de sedimentos (Kraal et al., 2013).

Un análisis más detallado de cada punto muestreado puede verse en el Anexo 6, donde se presentan los resultados obtenidos del ACP para cada punto de muestreo. Para el punto OS1 se observa que los dos primeros factores (F1, F2) representan el 91% de la variabilidad, destacando la correlación negativa entre la profundidad y la mayoría de los metales debido a la acumulación de metales en los niveles más superficiales (OS1/0-3) También se aprecia correlación positiva de Fe con Ni, Cd, Al, Mn, Cr y As, indicando una posible precipitación de estos elementos trazas con óxidos de Fe y Al presentes en sedimentos.

En el punto OS2 los dos primeros factores representan el 95% de la variabilidad, y se aprecia correlación positiva de Fe con Pb, As, Ca y P pudiendo indicar la presencia de óxidos de Fe que adsorben el P y estos metales traza. Por otro lado, se aprecia correlación positiva del Cu, Zn, Cd y S lo que puede indicar la precipitación de estos elementos traza con sulfuros. En el punto OS3 los factores F1 y F2 representan el 84% de la variabilidad, con concentraciones de Pb, Mn, Cd, As, S y P que aumentan en profundidad.

En el punto OS4 los factores F1 y F2 representa el 88% de la variabilidad. En este punto, hay correlación positiva de la profundidad con la mayoría de los cationes exceptuando Al, Ca y Mn. Asimismo, el Al presenta correlación positiva con Ca lo cual puede indicar la presencia de aluminosilicatos. Por otro lado, persiste la correlación de Fe con otros elementos trazas como son Cr, Co, Ni, As, Cd, Pb. En OS5, los dos primeros factores representan el 92% de la variabilidad de los datos, y se observan dos grupos de correlaciones principales, por un lado, se observa correlación de Fe, Cr, Ni, Co, Zn, Cu, Pb y S; y por otro lado hay un agrupamiento de Al, As, Mn, Ca y P. Esto podría indicar que en el primer grupo hay mayor sorción de los elementos trazas con óxidos e hidróxidos de Fe y en el segundo grupo con óxidos e hidróxidos de Al.

### 3.3. Características físico-químicas del agua de poro

La Figura 14 presenta la evolución del pH del agua de poro a lo largo de los diferentes testigos de sedimentos. Como se observa, el punto OS2 es el que presenta el valor medio de pH más bajo ( $\text{pH} = 6,00 \pm 0,31$ ), seguido del OS1 ( $\text{pH} = 7,10 \pm 0,12$ ). Estos valores de pH menores están relacionados con la ubicación de estos puntos dentro del estuario ya que son los que se encuentran en el margen interno del estuario del Río Odiel y, por ende, están expuestos a la mayor acidez asociada a la descarga del río. En los siguientes puntos se observa una mayor influencia de agua de mar, donde el punto OS5, que se ubica más próximo al mar, presenta el valor más alto de pH en el agua de poro contenida en los sedimentos superficiales (0-3 cm).

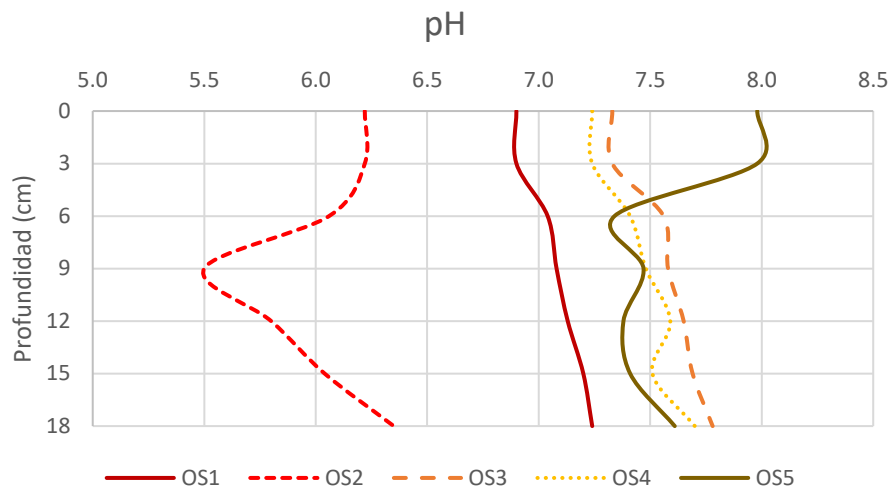
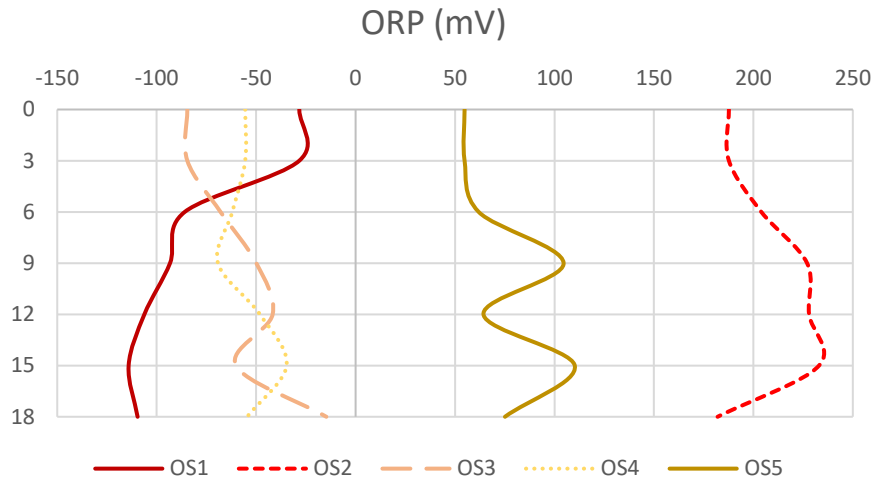


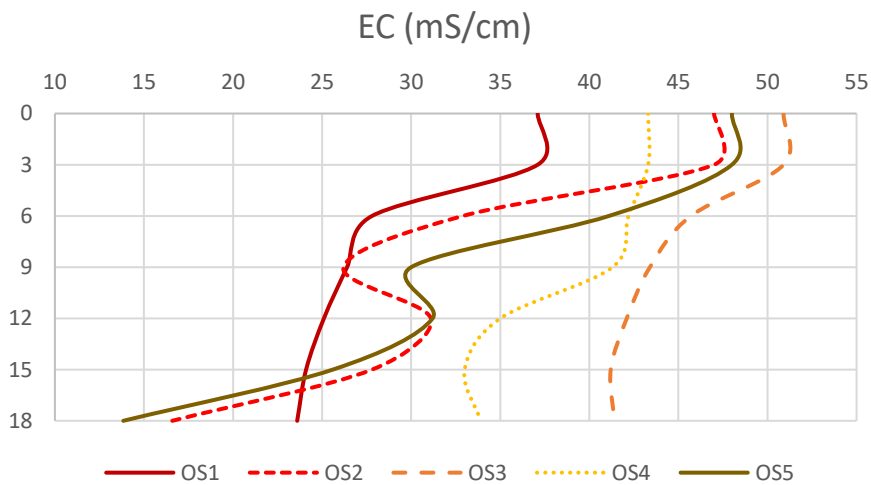
Figura 14. Valores de pH del agua de poro en los diferentes testigos de sedimentos

La evolución del potencial redox (ORP) en los perfiles indica unas condiciones predominantemente reductoras en los sedimentos (Figura 15), aunque en menor medida para los puntos OS2 y OS5. En el caso del OS5 podemos apreciar condiciones más oxidantes debido a la influencia de la entrada del agua salobre en el agua intersticial, al tener este punto los sedimentos con una textura franco-arenosa; facilitando por tanto la entrada de oxígeno disuelto en el agua intersticial de estos sedimentos.



**Figura 15. Valores de ORP del agua de poro en los diferentes testigos de sedimentos**

En relación con la conductividad eléctrica (Figura 16) se observa una tendencia espacial a lo largo de los perfiles de sedimentos. Por un lado, la CE disminuye con la profundidad en todos los puntos de muestreo, mientras que por otro incrementa a medida que nos acercamos al mar, debido a la mayor influencia del agua de mar. No obstante, el punto OS3 fue el que registró los mayores valores de CE.



**Figura 16. Valores de conductividad eléctrica del agua de poro en los diferentes testigos de sedimentos**

### 3.4. Concentración de metales en agua de poro

Los elementos con mayor presencia en el agua de poro son en orden decreciente Fe>Mn>Al>Zn. A continuación, en la Figura 17, se ilustra mediante gráficos de dispersión el comportamiento espacial para estos elementos. Cabe destacar que los gráficos para Al, Fe y Zn se encuentran en escala logarítmica para mejorar su visualización y se omitió representar el punto OS5, debido a que únicamente se recuperó agua de poro en los primeros 3 cm. Como se observa, los puntos con mayor influencia fluvial (OS1 y OS2) presentan la mayor concentración de metales disueltos en el agua de poro, destacando el punto OS1 por su alto contenido de Fe (5828 ppb) y el punto OS2 que presenta las mayores concentraciones de Al (195 ppb) y Zn (3,6 ppb).

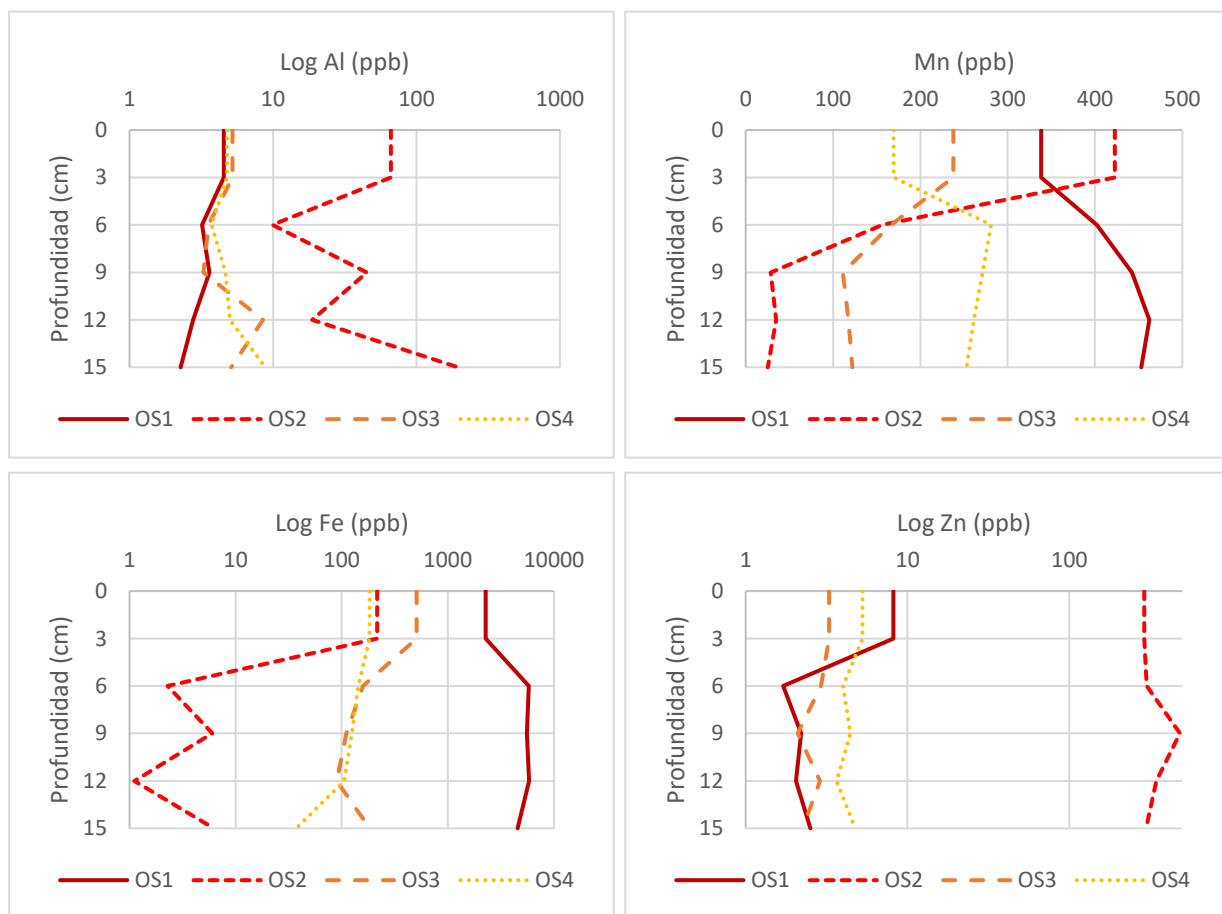
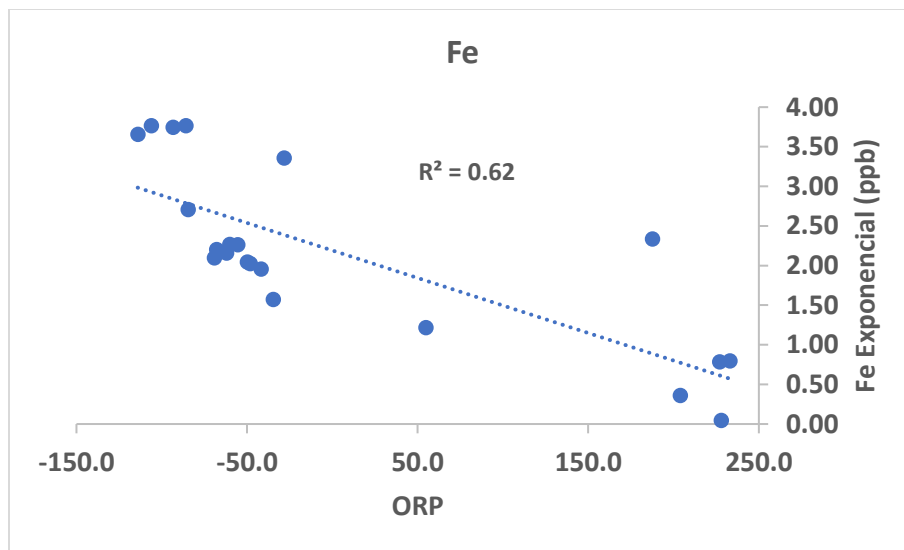


Figura 17. Concentraciones Fe, Zn, Mn y Al en agua de poro de sedimentos estuarinos estudiados.

Estos resultados concuerdan con las características fisicoquímicas del agua de poro, pues en condiciones oxidantes el Fe está presente en gran medida como Fe(III), que es altamente insoluble, mientras que en condiciones reductoras se produce una reducción del Fe (III) disponible a Fe (II). Esta elevada concentración de Fe(II) podría deberse a la disolución en condiciones reductoras de fases minerales de Fe(III), que provoca además la liberación de elementos retenidos en estas fases minerales de Fe(III) (Hooda, 2010).

La correlación de los valores de ORP (Figura 15) de los puntos OS1 y OS2 con la concentración de Fe (Figura 18) muestra una coincidencia del ambiente más reductor (OS1:  $-89,57 \pm 31,81$  mV) y el más oxidante (OS2:  $210,28 \pm 22,18$  mV) con las concentraciones de Fe más altas (OS1:  $4\,794,9 \pm 1\,506,2$  ppb) y bajas (OS2:  $46,3 \pm 94,7$  ppb), respectivamente. En la Figura 18 se ilustra la correlación de las concentraciones de Fe (como logaritmo base 10) con respecto a los valores de ORP, obteniendo un  $R^2=0,62$ .



**Figura 18. Gráfico de dispersión de ORP y Log Fe**

Resultados análogos fueron encontrados por Yuan et al. (2020), quienes expusieron columnas de sedimentos lacustres contaminados con metales a condiciones óxicas y anaeróbicas, encontrando que la concentración total de Fe en el sedimento disminuyó en sedimentos expuestos a condiciones anaeróbicas, a la vez que en estas mismas condiciones aumentaron las concentraciones lábiles de  $Fe^{2+}$ . De este modo, las condiciones anóxicas causan la reducción y disolución de los óxidos férricos presentes en sedimentos y la consecuente liberación de hierro ferroso en el agua de poro.

### 3.5. Concentración en extracciones secuenciales (fracción ácida extractable, intercambiable y unida a carbonatos)

La Tabla 4 resume las concentraciones detectadas en blancos de las extracciones secuenciales realizadas.

**Tabla 4. Resultados de blancos en extracciones secuenciales**

Solución	Al	Cr	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
Blanco Ácido Acético (ppb)	1.451	0.043	0.125	5.093	0.073	0.101	2.111	<LD	<LD	0.060
Blanco MgCl <sub>2</sub> (ppb)	1.319	0.032	0.517	6.850	0.067	0.116	1.936	<LD	0.002	0.104
Blanco NaAc (ppb)	2.278	0.083	0.099	1.651	0.086	0.226	2.794	<LD	0.003	0.051

Las figuras 19-24 representan los resultados obtenidos en los primeros pasos de las extracciones secuenciales, correspondientes a las fracciones más lábiles. Los metales más móviles en orden decreciente fueron Mn (Figura 19)>Cd (Figura 20)>Zn (Figura 21) que se liberaron entre 5-67% para la fracción BCR y entre 1-57% para fracción 2 (F2) de Tessier. Para esta última fracción el orden decreciente fue Cd>Zn>Mn. Los siguientes elementos con mayor porcentaje extraído fueron Al (Figura 22), Cu (Figura 23) y Pb (Figura 24) que se liberaron entre 1-47% para BCR y 0-33% para F2 Tessier. Todos los demás elementos presentan una liberación inferior al 20% para todas las fracciones evaluadas.

Se aprecia que todos los elementos, exceptuando el Pb, presentaron mayor liberación para la fracción BCR, lo cual se debe porque se empleó mayor relación sólido: líquido (40:1) para esta extracción que para la fracción Tessier (3:24), además que la fracción de BCR incluye tanto los elementos fácilmente intercambiables (ácida extractable) como los unidos a carbonatos; en cambio el procedimiento de Tessier divide a estos elementos en dos fracciones (F1 y F2). No obstante, se aprecia correlación positiva entre la fracción BCR (ácida extractable y carbonatos) y F2 Tessier (asociada a carbonatos) para la mayoría de los elementos ( $R^2$  para Al: 0,97; Fe: 0,96; Cu: 0,97; Zn: 0,92; Ni: 0,85; As: 0,87; Cd: 0,83), en el anexo 7 se incluye las gráficas de correlación para estos elementos.

Esto podría indicar que los extractantes empleados atacan a minerales similares, fácilmente solubles en condiciones de baja acidez (por ejemplo, óxidos de Fe, Mn de baja cristalinidad, carbonatos y sulfuros neoformados). En cambio, en relación con la extracción con MgCl<sub>2</sub> se presenta una baja correlación (salvo para el Cu), debido a que esta solución solo extrae aquellos metales unidos débilmente al sedimento por sorción.

En relación con los puntos muestreados, para BCR los mayores porcentajes de extracción se presentaron en los puntos OS2 y OS5. En el caso de Tessier para F1 los únicos metales para los cuales se obtuvieron porcentajes de extracción superiores al 10% fueron Mn, Zn, Cd, y para estos elementos los mayores ratios fueron identificados en los puntos OS1 y OS2. Para F2 los porcentajes de extracción más altos fueron identificados principalmente en OS5 (Cr, Mn, Fe, Ni, Zn, As, Cd, Pb), lo cual probablemente se debe a que por su ubicación (mayor influencia mareal) en el punto OS5 hay mayor presencia de carbonatos.

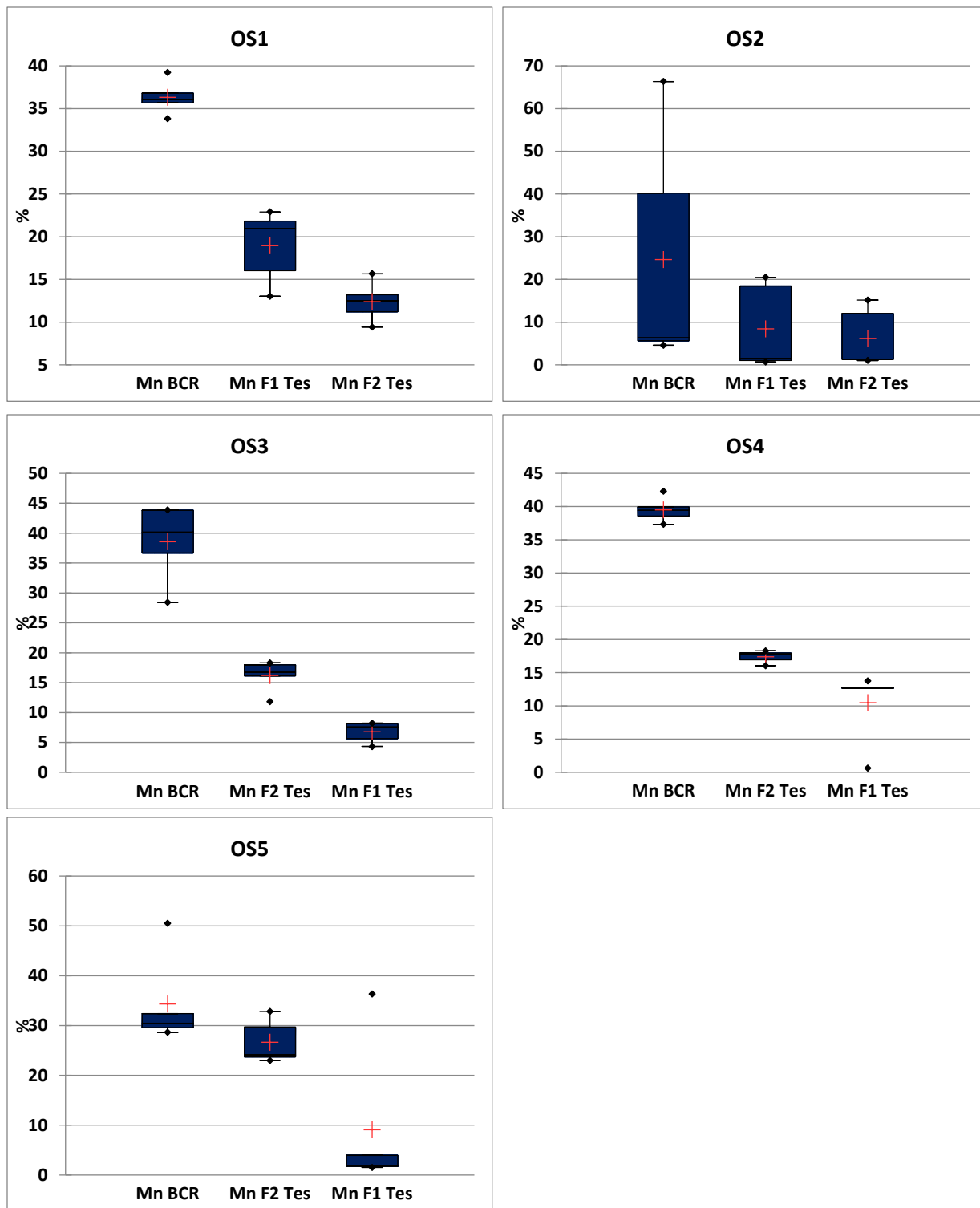


Figura 19. Diagramas de caja de extracciones de Mn en sedimentos estuarinos



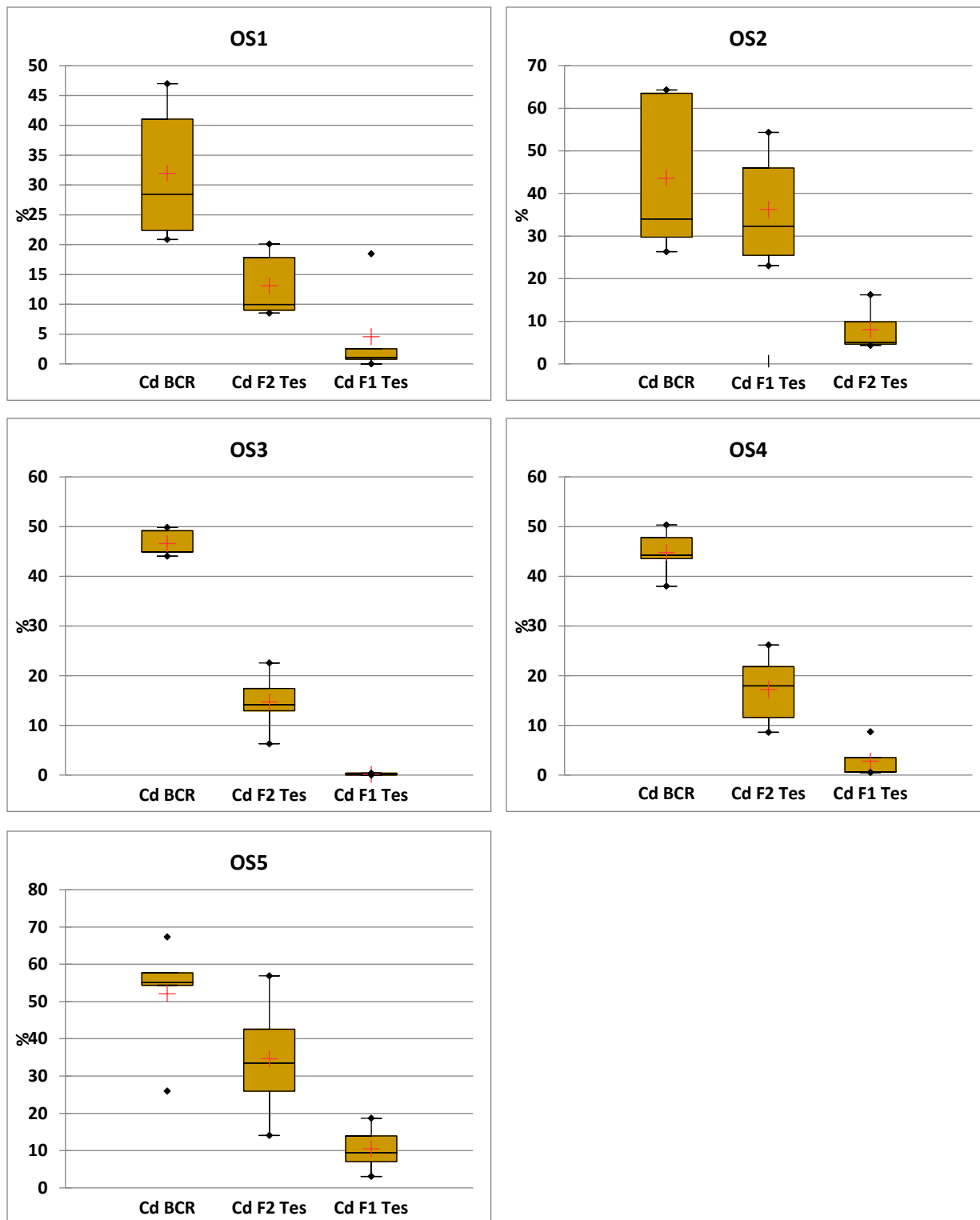


Figura 20. Diagramas de caja de extracciones de Cd en sedimentos estuarinos

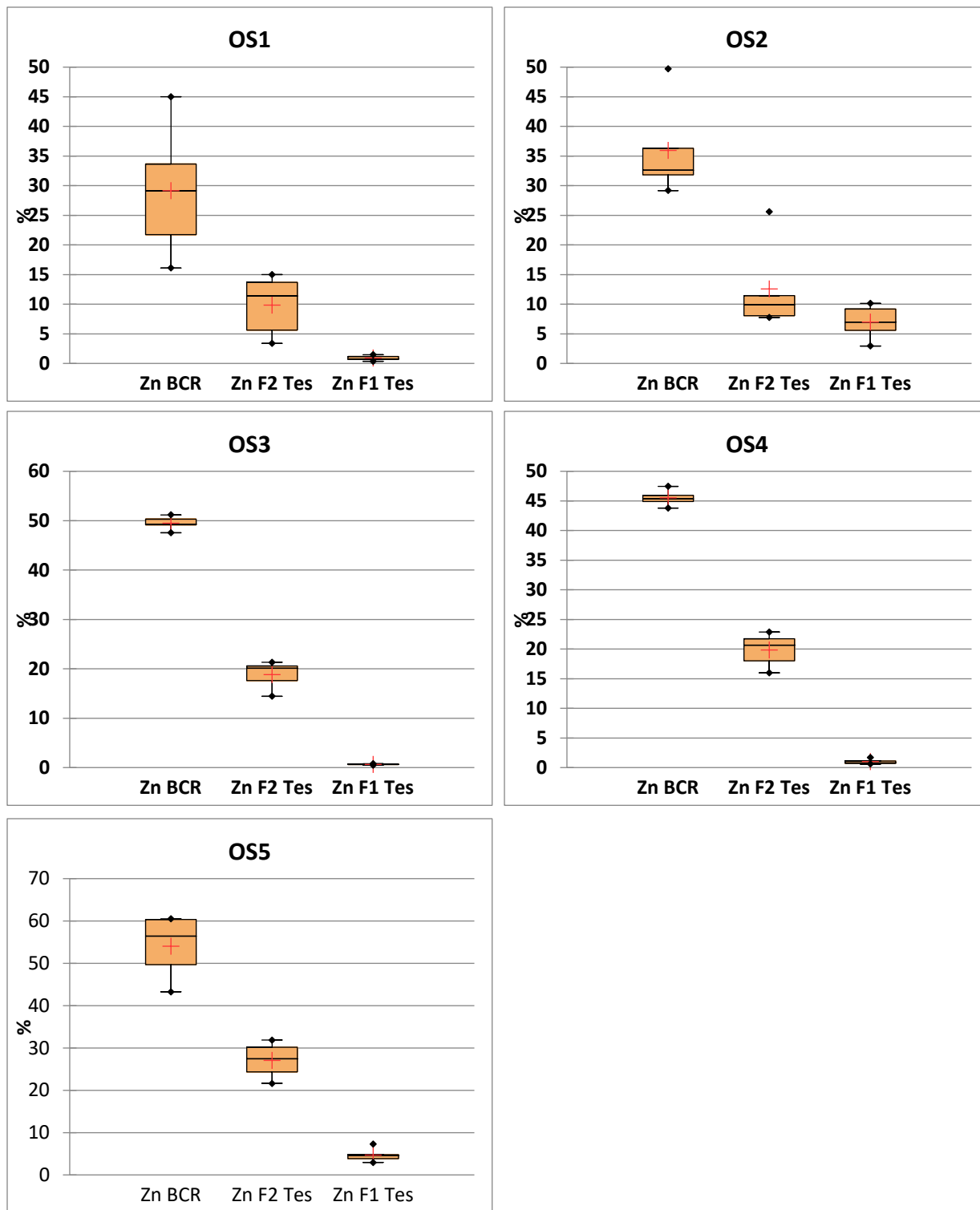


Figura 21. Diagramas de caja de extracciones de Zn en sedimentos estuarinos

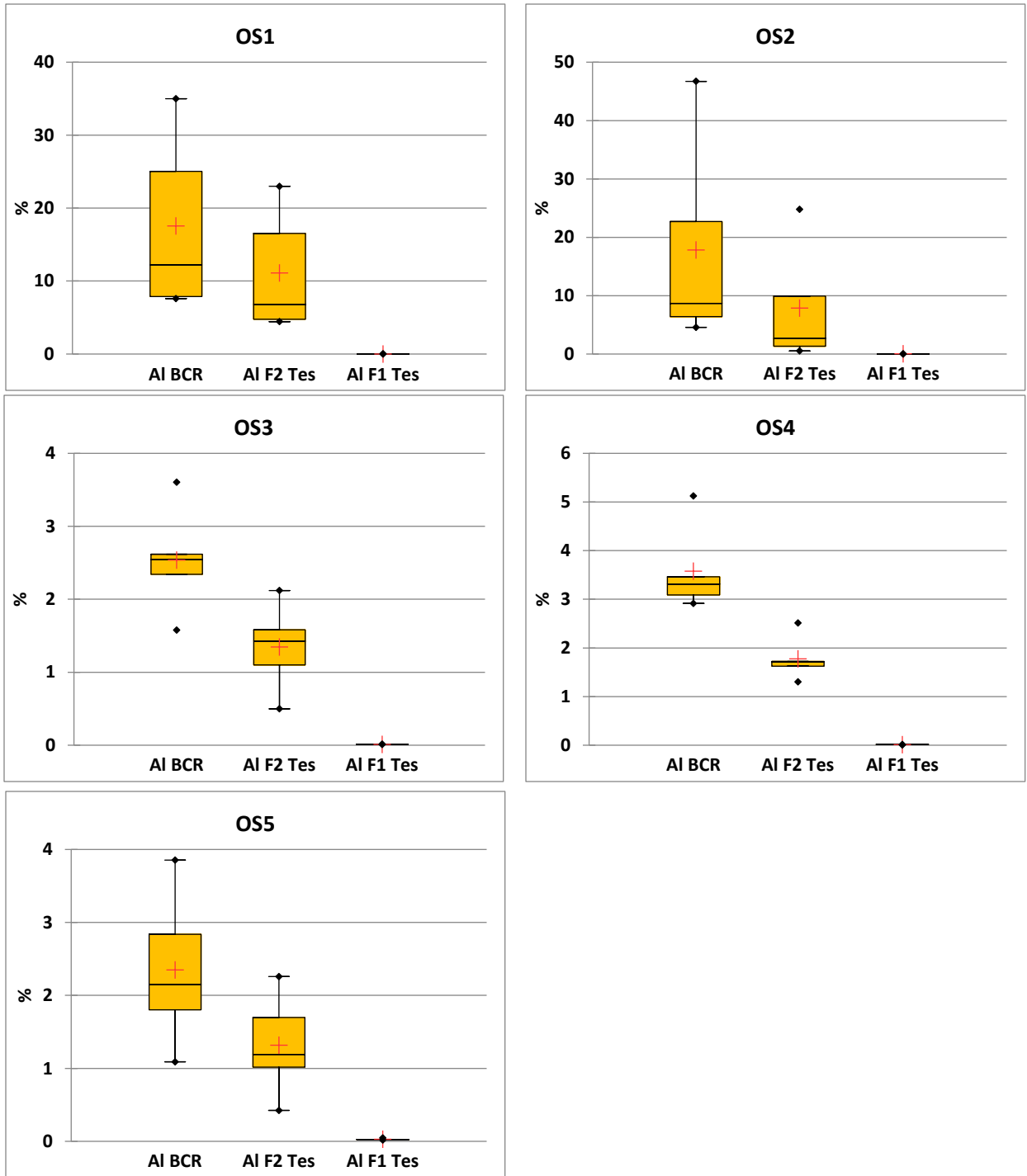


Figura 22. Diagramas de caja de extracciones de AI en sedimentos estuarinos

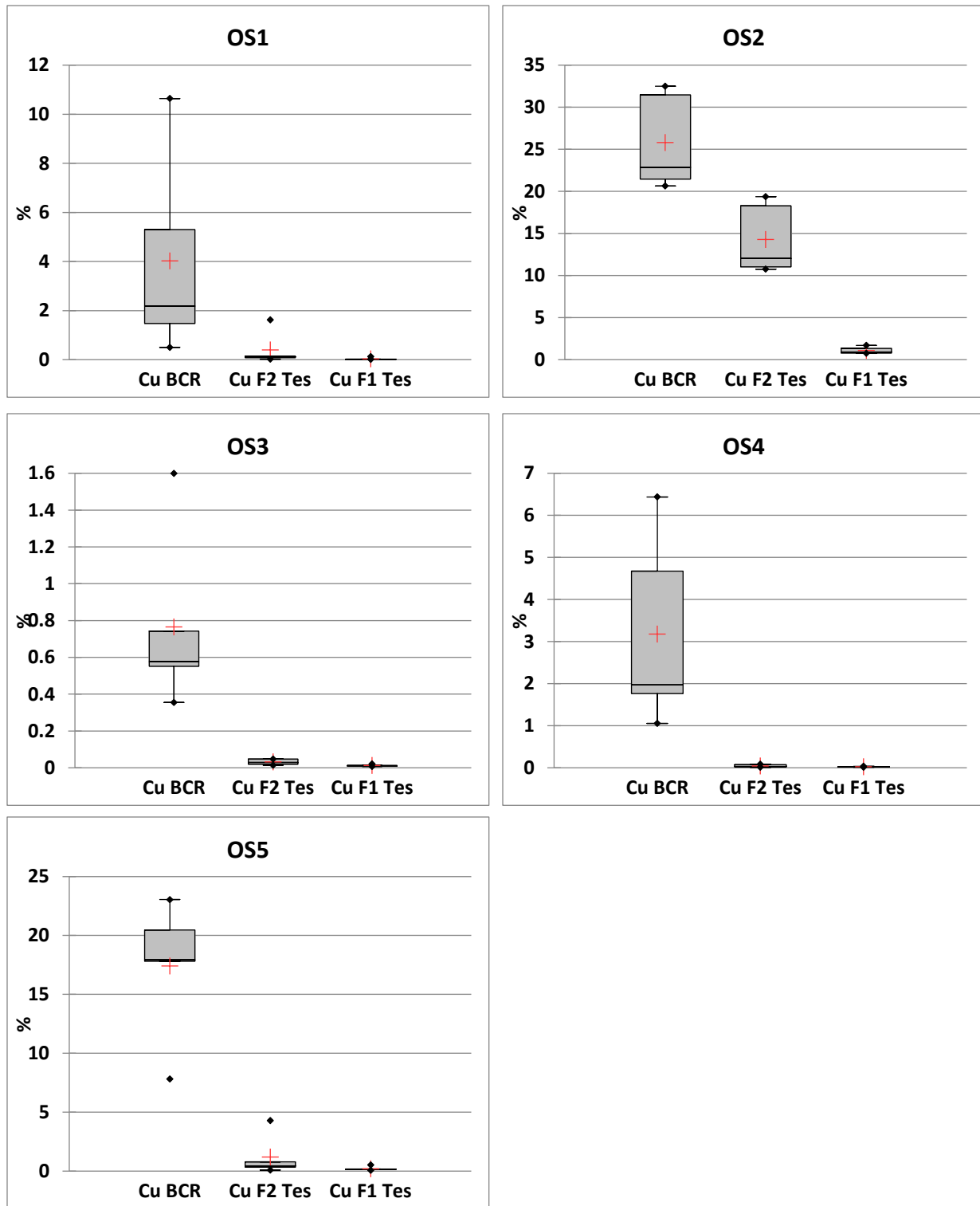


Figura 23. Diagramas de caja de extracciones de Cu en sedimentos estuarinos

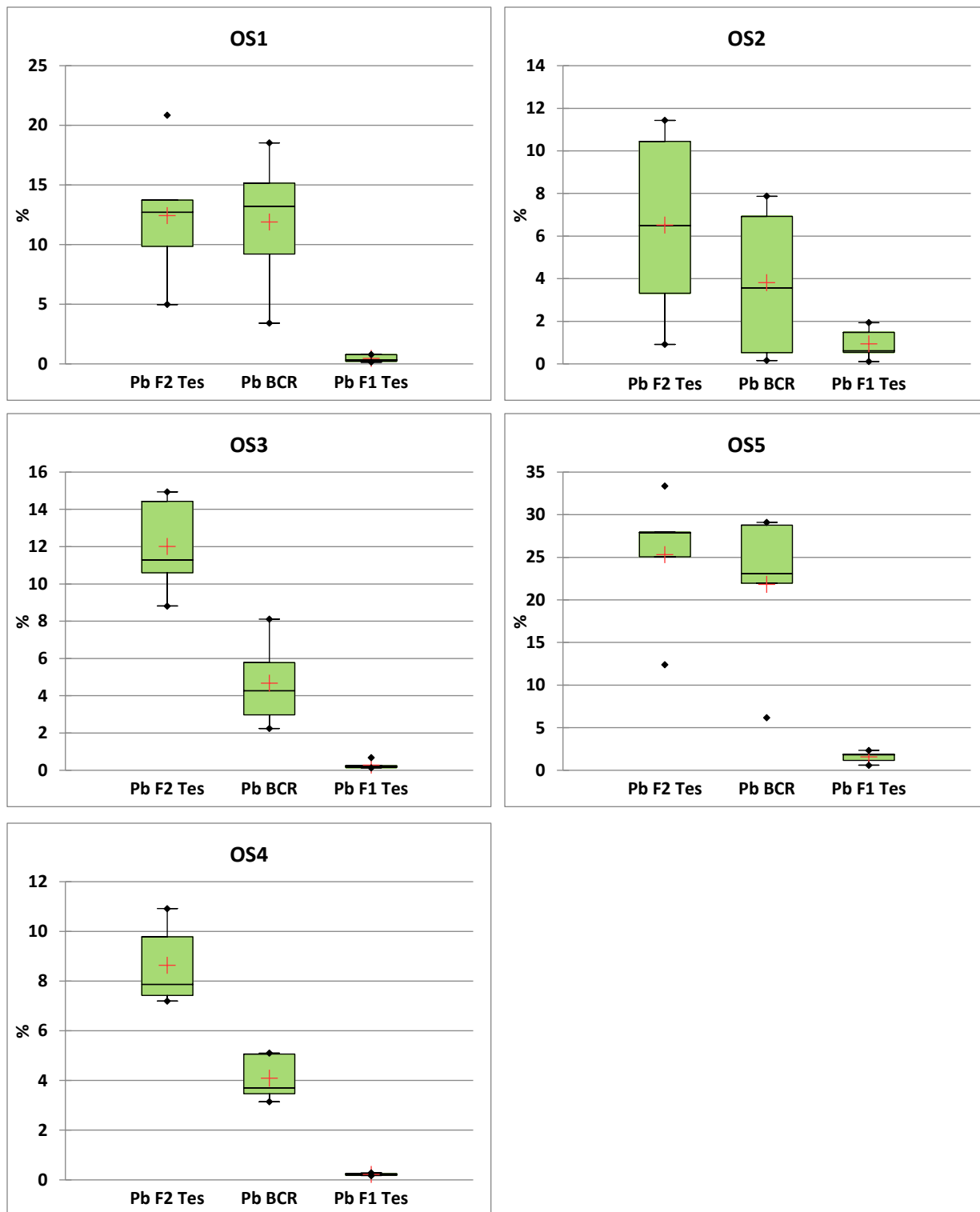


Figura 24. Diagramas de caja de extracciones de Pb en sedimentos estuarinos

### 3.6. Concentración de metales acumulados en DGT

En las figuras 25, 26 y 27 se ilustran las concentraciones de metales acumulados en DGT en profundidad para cada punto. En el caso de Fe, las mayores concentraciones en DGT se observaron en OS1 (24089 ppb Fe para 12h; Fig. 25), y para Mn tanto en OS1 (1167 ppb Mn para 12h; Fig. 25) como en OS4 (1182 ppb Mn para 12h; Fig. 25), especialmente en profundidad. Esto puede deberse a los procesos de reducción de los óxidos de Fe y Mn contenidos en el sedimento, que provocan su transferencia al agua de poro. Para Mn, esta misma evolución se observa en OS3 y OS4. En el caso del Al, las mayores concentraciones se observaron en OS1 y OS2 (OS1: 1579 ppb Al para 12h; OS2: 1601 ppb Al para 12h; Fig. 25). En el caso de Cu y Zn, esta tendencia de concentraciones progresivas en profundidad también es observada, aunque en el caso del Zn las máximas concentraciones se registraron en OS2 (684 ppb Zn para 12h; Fig. 26) mientras que para Cu se observaron en OS1 y OS4, especialmente a las 12h (OS1: 137 ppb para 12h; OS4: 192 ppb para 12h; Fig. 26).

La misma tendencia que Zn es observada para Cd, con las mayores concentraciones observadas en OS2 en profundidad (684,5 ppb Zn; Fig. 26 y 5,71 ppb Cd para 12h; Fig. 27). Ambos elementos tienen un comportamiento geoquímico similar, siendo incorporados en la esfalerita. Por tanto, es probable, que los procesos redox observados debido al efecto de las mareas provoque la reoxidación de los sulfuros neoformados, dando lugar a la liberación de Cd y Zn, que son retenidos por los DGT en contacto con el agua de poro. En el caso de As, existe una mayor retención en OS4 (5,4 ppb As para 24 h, Fig. 27) en los niveles más superficiales. Los sulfuros pueden retener cantidades significativas de As, que en contacto con oxígeno vuelven a ser liberados al agua de poro, aunque si las condiciones óxicas persisten pueden incorporarse a los óxidos de Fe mediante coprecipitación (Acero et al., 2006).

Sin embargo, algunas discrepancias entre los tiempos de contacto fueron observados durante la monitorización con DGTs. Comparando ambos tiempos de contacto se aprecia disparidad en los resultados de fracciones lábiles detectadas dentro de los mismos puntos, especialmente para Al y Pb. Esto puede deberse a la saturación de la resina y la competencia entre cationes por los sitios de quelación (Gao et al., 2019).

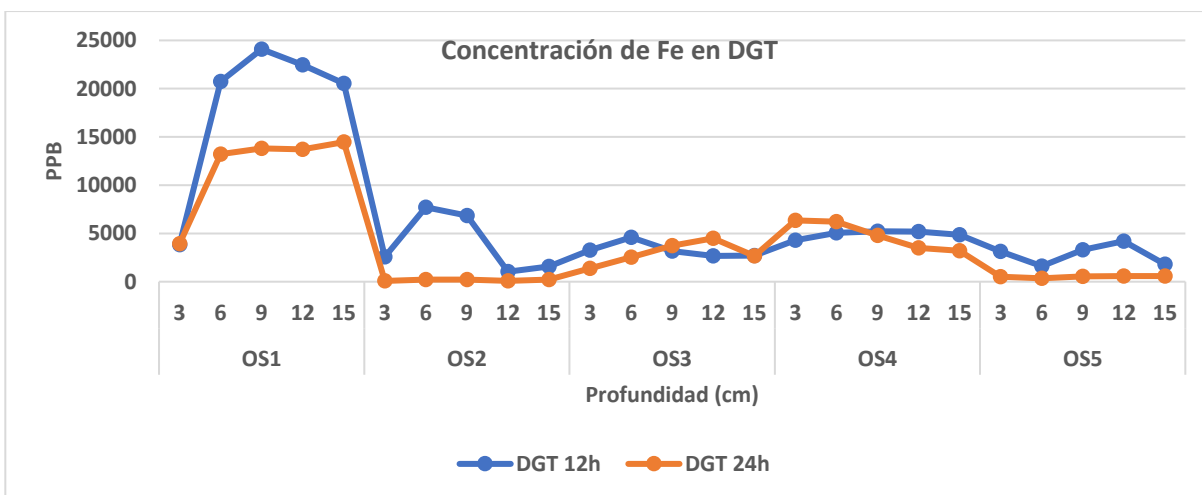
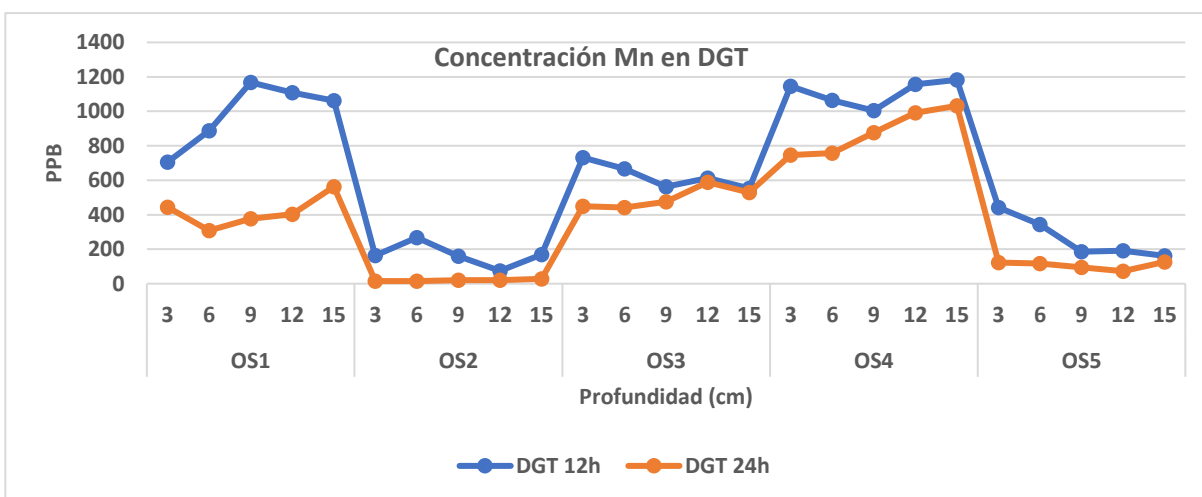
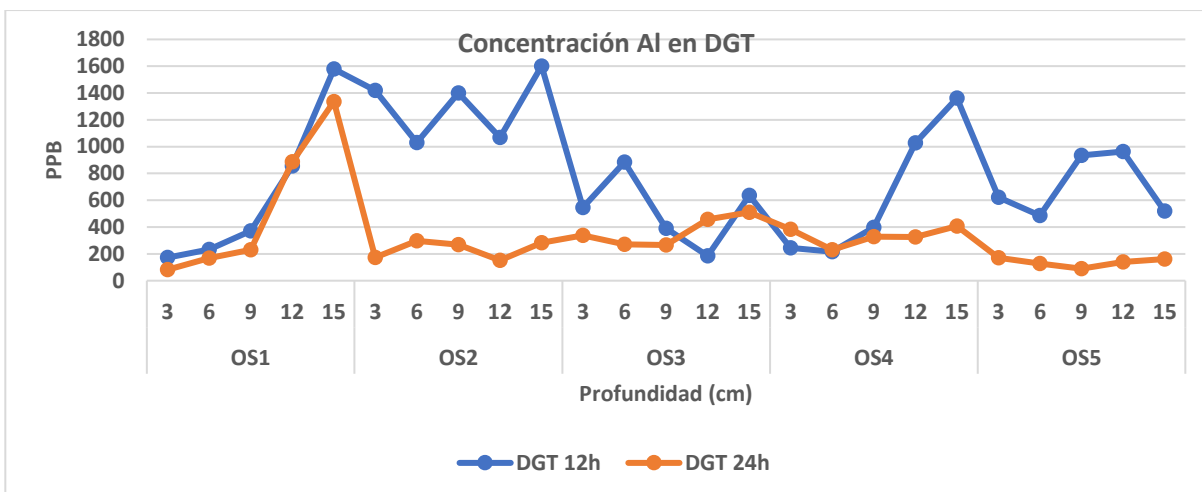


Figura 25. A) Concentración de Al; B) Concentración de Mn; C) Concentración de Fe en DGT

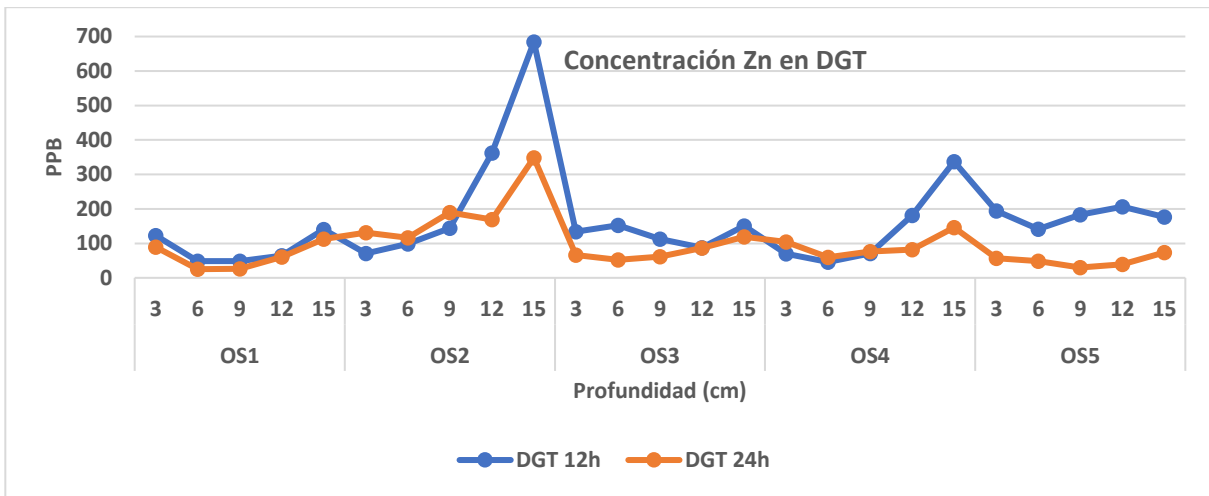
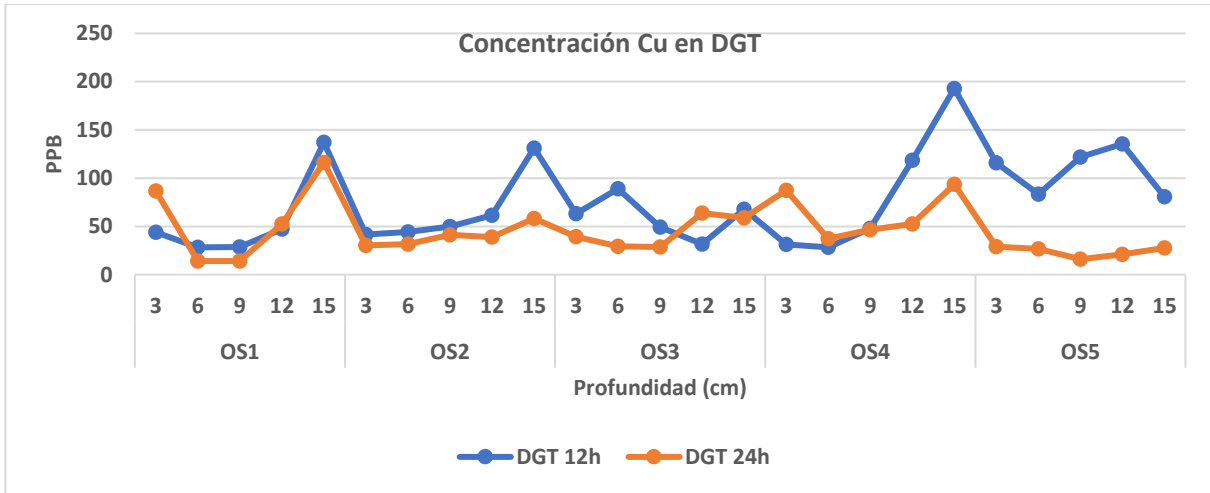


Figura 26. A) Concentración de Cu; B) Concentración de Zn en DGT



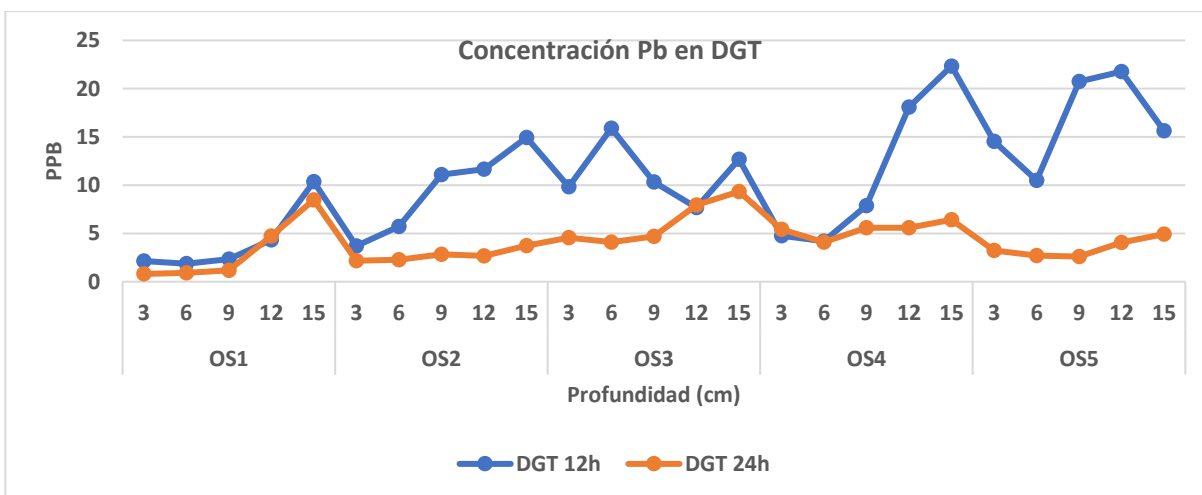
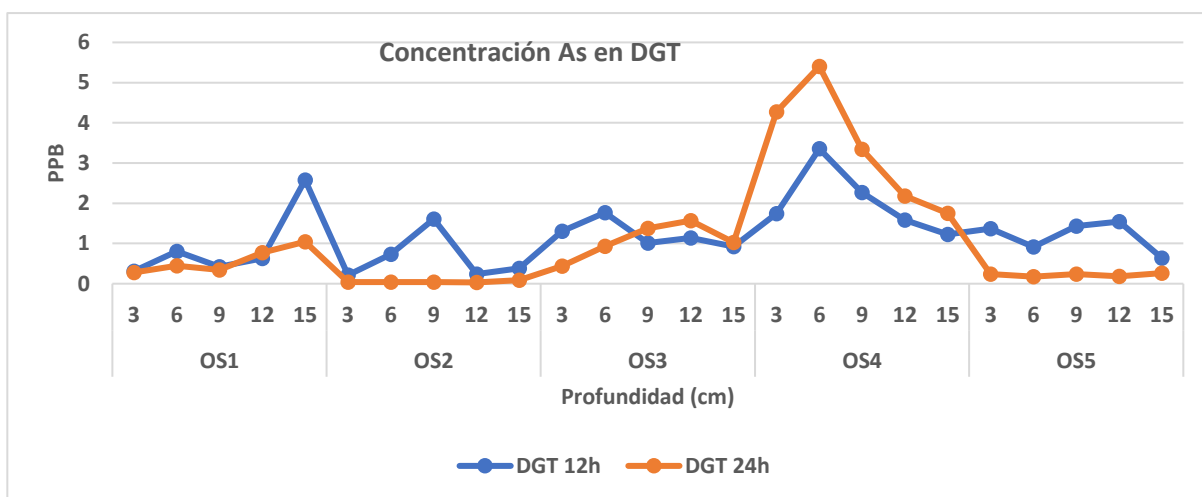
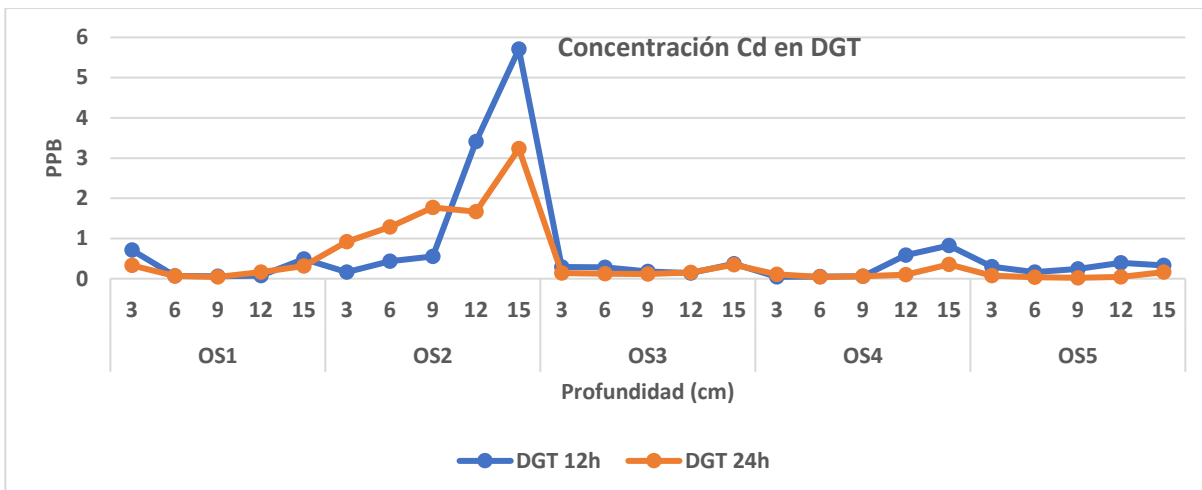


Figura 27. A) Concentración de Cd; B) Concentración de As; C) Concentración de Pb en DGT

Con el objetivo de comparar estadísticamente si existe diferencias significativas dependiendo de las horas de contacto de los DGTs, se procedió a realizar una comparación de medias entre ambos tiempos de contacto para cada uno de los puntos y elementos analizados. Inicialmente, se realizó una prueba de normalidad Shapiro-Wilk para cada punto y tiempo de contacto empleado. En los casos donde se presentó normalidad de los datos para ambos puntos, se llevó a cabo una prueba de comparación de medias T-Student para muestras emparejadas; y en los puntos donde no se sigue una distribución normal se utilizó la prueba de comparación de rangos de Wilcoxon. En el anexo 8 se incluyen los resultados de p-valor tabulados para cada una de las pruebas de normalidad. Y a continuación, en la Tabla 5 se resumen los p-valores calculados obtenidos de las pruebas de comparación de medias, para 12 y 24 h de contacto, de metales acumulados en DGT por punto.

El metal que presentó mayor variabilidad fue el Mn, para el cual se identificó diferencia significativa entre sus medias para todos los puntos. Con respecto a los puntos de muestreo, el punto con mayor influencia mareal: OS5 fue el único que presentó diferencia significativa entre las medias de todos los elementos trazas, exceptuando Ni. Es decir que para estas observaciones se puede aceptar que hubo mayor acumulación durante las 12h de contacto. Como se mencionó previamente la posible razón de las mayores concentraciones de cationes para las 12 horas de contacto puede ser producto de saturación de las resinas. Fe, Cu y Cd fueron los cationes con mayor homogeneidad entre sus respectivas medias.

**Tabla 5. Resultados P-valor de pruebas para comparación de medias: T de student y Wilcoxon**

Punto/Variable	Al	Mn	Fe	Ni	Cu	Zn	As	Cd	Pb
OS1	<b>0.04*</b>	<b>0.00*</b>	0.19	<b>0.00*</b>	0.41	<b>0.01*</b>	0.19**	0.16	0.19**
OS2	<b>0.00*</b>	<b>0.01*</b>	0.06**	<b>0.02*</b>	0.06**	0.18	0.06**	0.37	<b>0.01*</b>
OS3	0.16	<b>0.03*</b>	0.35	1.00**	0.17	<b>0.02*</b>	0.30	0.06**	<b>0.03*</b>
OS4	0.11	<b>0.01*</b>	0.45	<b>0.00*</b>	0.25	0.17	<b>0.01***</b>	0.81**	0.08
OS5	<b>0.00*</b>	<b>0.02*</b>	<b>0.00*</b>	0.06	<b>0.00*</b>	<b>0.00*</b>	<b>0.00*</b>	<b>0.00*</b>	<b>0.00*</b>

\*Valor no superan el nivel de significancia para prueba de comparación de 2 muestras con T-Student, se rechaza la hipótesis nula ( $H_0: \bar{x}_{12h} = \bar{x}_{24h}$ ;  $H_a: \bar{x}_{12h} > \bar{x}_{24h}$ ).

\*\*Prueba rangos con signo de Wilcoxon para dos muestras.

\*\*\* $H_0: \bar{x}_{12h} = \bar{x}_{24h}$ ;  $H_a: \bar{x}_{12h} < \bar{x}_{24h}$

Nivel de significación alfa=0.05.

### 3.7. Comparación de concentración acumulada en DGT, agua de poro y extracciones secuenciales.

Para validar la capacidad de los DGTs en la monitorización de la fracción lábil en sedimentos estuarinos se comparó la concentración acumulada en los DGTs con la observada en el agua de poro. Cabe destacar que las muestras de agua de poro que superaron las fracciones lábiles detectadas en DGT corresponden a los sedimentos más superficiales (0 a 9 cm), lo cual podría indicar que en este punto transcurre el agua con mayor concentración disuelta y a medida que se infiltra verticalmente, y aumentan las condiciones reductoras, por el decaimiento de oxígeno, incrementa la precipitación de metales debido a procesos de sulfato-reducción. En otros casos la acumulación de metales en DGT fue superior a la observada en el agua de poro. Esta mayor acumulación de metales en DGT que en agua de poro puede reflejar, como se ha visto en otros estudios similares (Xie et al., 2021), que la magnitud del flujo de metales en DGT está influenciado tanto por la presencia de metales libres presentes en el agua de poro y la liberación de fracciones disponibles procedentes de las partículas de sedimentos. Una comparación entre la concentración en el agua de poro y en DGTs indica que no existe correlación entre la acumulación de metales en DGT y concentraciones reportadas en agua de poro, excepto para Fe donde se identificó un coeficiente de correlación  $R^2=0,89$  para 12h y  $R^2=0,82$  para 24h (Figura 28).

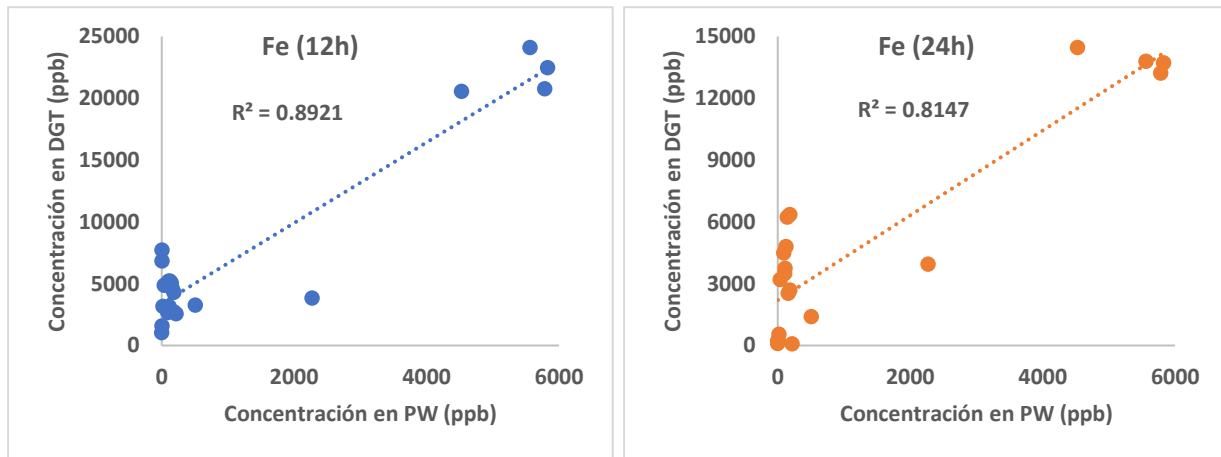


Figura 28. Relación lineal de la concentración de Fe en agua de poro (PW) y acumulación en DGT.

Esta ausencia de correlación entre ambas concentraciones puede deberse a que cualquier cambio causado en el agua de poro durante la colecta, almacenamiento y/o manipulación de los sedimentos pudo haber influido en la fisicoquímica del agua y ocasionar procesos oxidativos por exposición de la matriz al aire, que generan precipitación de algunos metales. Esto ha sido corroborado por algunos autores como Simpson & Batley (2003) quienes demostraron que cambios menores en sedimentos enriquecidos con Fe (II) pueden causar cambios mayores en la partición de metales, pues la exposición del agua de poro al aire causa decaimiento en las concentraciones de Fe(II). Probablemente debido a la precipitación como hidróxidos de Fe(III) y a su vez disminuyen concentraciones de otros metales susceptibles de coprecipitación con estos hidróxidos como es el caso de Zn, Cu, Pb y en menor medida Mn, Ni y Cd. Además, mencionan que los procesos oxidativos y reductivos no cesan, aunque los sedimentos estén debidamente almacenados y preservados. En el caso de las extracciones secuenciales, no se observó tampoco correlación entre la concentración de metales en DGTs y las fracciones más lábiles (fácilmente intercambiable, ácida y asociada a carbonatos).

## 4. CONCLUSIONES

Este estudio trata de evaluar la distribución y biodisponibilidad de metales en sedimentos estuarinos afectados por contaminación minera con diferente influencia mareal. Para ello, se muestrearon sedimentos a lo largo del estuario del Río Odiel, y se determinó la concentración de metales en las fracciones lábiles (agua de poro, DGTs, fracción asociada a carbonatos, fácilmente intercambiable y extraíble en condiciones ácidas). Las mayores concentraciones de metales totales detectados en sedimentos y agua de poro (PW) fueron detectadas en los puntos con mayor influencia fluvial: OS1 y OS2, coincidiendo con los valores más bajos de pH en agua de poro. Por el contrario, el punto con mayor influencia mareal (OS5) fue el que presentó los mayores valores de pH y menores concentraciones de metales para todas las matrices analizadas: sedimentos, agua de poro y DGT. En relación con la dinámica fisicoquímica del medio, hay correlación positiva de las concentraciones de los elementos trazas con la influencia fluvial y el porcentaje de granos finos contenido en los sedimentos. Además, se puede concluir que las concentraciones de elementos trazas en sedimentos están fuertemente influenciadas por la (co)precipitación y sedimentación con óxidos e hidróxidos de Fe, Al; y de sulfuros metálicos para los elementos calcófilos.

En agua de poro los puntos con mayor influencia fluvial (OS1 y OS2) fueron los que presentaron las mayores concentraciones de metales disueltos, destacando la presencia de Fe en OS1 y Al, Zn en OS2. Este comportamiento del Fe está fuertemente influenciado por las condiciones redox de la matriz, coincidiendo los puntos con ambientes más reducidos y oxidados con las concentraciones más altas y bajas de Fe respectivamente, lo cual se debe a que en condiciones reducidas se produce la reducción del  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$ , aumentando así la solubilidad de este.

En las extracciones secuenciales los metales que presentaron mayor porcentaje de extracción fueron Mn, Cd, Zn (5-67% BCR; 1-57% F2 Tessier), seguidos de Al, Cu, Pb (1-47% BCR; 1-33% F2 Tessier), observándose en todos los casos mayor extracción con el método BCR debido al uso de una mayor ratio sólido: líquido y al hecho que esta fracción incluye tanto los elementos que son fácilmente extractables como los que están unidos a carbonatos. No obstante, hay correlación positiva para la mayoría de los elementos traza ( $R^2$  para Al: 0,97; Fe: 0,96; Cu: 0,97; Zn: 0,92; Ni: 0,85; As: 0,87; Cd: 0,83) entre BCR y F2 Tessier, indicando que ambos extractantes (ácido acético y acetato de sodio) atacan minerales similares, como óxidos Fe, Mn, carbonatos, sulfuros neoformados, caracterizados por ser fácilmente solubles en condiciones de baja acidez.

Se concluye que en DGT hay un comportamiento heterogéneo de los metales en cada punto, presentándose en OS1 las mayores concentraciones de Fe; en OS2 las de Al, Zn, Cd; en OS3 Ni; y en OS4 Mn, As, Pb y Cu. No obstante, se aprecia un incremento de las concentraciones de los metales, exceptuando en As, con la profundidad posiblemente por la reducción de óxidos de Fe y Mn que ocasiona la disolución de estos y consecuente acumulación en los DGT. En el caso del As las mayores concentraciones se reportan en puntos superficiales del punto OS4. Se observó una disparidad de las concentraciones de fracciones lábiles obtenidas con DGT con los tiempos de contacto empleados (12 y 24 h), destacando que no se presentó mayor acumulación de metales con el aumento del tiempo de contacto sino al contrario, se observaron valores similares en algunos puntos e incluso en otros se observó mayor concentración para 12 h de contacto. Este comportamiento posiblemente se debe a la saturación de las resinas y competencia de los cationes por espacios en las mismas.

A diferencia de otros trabajos, no se encontró correlación entre la concentración de metales en agua de poro y DGT, exceptuando el caso de Fe ( $R^2=0,89$  para 12h y  $R^2=0,82$  para 24h). La ausencia de correlación posiblemente se debe a cambios en las condiciones fisicoquímicas del agua de poro, como puede ser la oxidación, durante la manipulación de la matriz. Como ha sido evidenciado por otros autores, pequeños cambios en sedimentos enriquecidos con Fe pueden ocasionar cambios significativos en la partición tanto del Fe como de otros metales susceptibles de coprecipitación.

## 5. REFERENCIAS

- Acero P, Ayora C, Torrent C, Nieto JM. The behavior of trace elements during schwertmannite precipitation. *Geochim Cosmochim Acta* 2006; 70:4130–9.
- Berry, W. J., Hansen, D. J., Boothman, W. S., Mahony, J. D., Robson, D. L., Toro, D. M. D., Shipley, B. P., Rogers, B., & Corbin, J. M. (1996). Predicting the toxicity of metal-spiked laboratory sediments using acid-volatile sulfide and interstitial water normalizations. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(12), 2067-2079. <https://doi.org/10.1002/etc.5620151203>
- Burkhard, L. (2016). *Deriving Sediment Interstitial Water Remediation Goals ( IWRGs ) at Superfund Sites for the Protection of Benthic Organisms from Direct Toxicity*. [https://www.semanticscholar.org/paper/Deriving-Sediment-Interstitial-Water-Remediation-\(-Burkhard/b9437a7757f37a726a17191a8a8b65513f47756b](https://www.semanticscholar.org/paper/Deriving-Sediment-Interstitial-Water-Remediation-(-Burkhard/b9437a7757f37a726a17191a8a8b65513f47756b)
- Cánovas, C. R., Basallote, M. D., Borrego, P., Millán-Becerro, R., & Pérez-López, R. (2020). Metal partitioning and speciation in a mining-impacted estuary by traditional and passive sampling methods. *Science of The Total Environment*, 722, 137905. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137905>
- Cánovas, C. R., Basallote, M. D., & Macías, F. (2020). Distribution and availability of rare earth elements and trace elements in the estuarine waters of the Ría of Huelva (SW Spain). *Environmental Pollution*, 267, 115506. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.115506>
- Caraballo, M. A., Serna, A., Macías, F., Pérez-López, R., Ruiz-Cánovas, C., Richter, P., & Becerra-Herrera, M. (2018). Uncertainty in the measurement of toxic metals mobility in mining/mineral wastes by standardized BCR®SEP. *Journal of Hazardous Materials*, 360, 587-593. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2018.08.046>
- Carro, B., Borrego, J., & Morales, J. (2019). Estuaries of the Huelva Cost: Odiel and Tinto Estuaries (SW Spain). En *The Spanish Coastal Systems: Dynamic Processes, Sediments and Management*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-93169-2>
- Delgado Morales, D. (2018). *ANÁLISIS CRÍTICO DE LOS MÉTODOS DE EXTRACCIÓN SECUENCIAL PARA MUESTRAS DE SUELOS Y SEDIMENTOS*. Universidad de Chile.

Departamento de Agricultura, U. (1999). Estimaciones y observaciones de física del suelo. En *Guía para la Evaluación de la Calidad y Salud del Suelo* (p. 77). [https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE\\_DOCUMENTS/nrcs142p2\\_051913.pdf](https://www.nrcs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/nrcs142p2_051913.pdf)

DGT Reserach Ltd. (2018). *Guide to deploying DGT probes in sediments*. <https://www.dgtresearch.com/wp-content/uploads/2020/11/DGT-sediment-deployment-guide-A2-20-181120.pdf>

E. D. Amato; T. Bolam; M. J. Belzunce-Segarra. (2019). *Guidelines for the use of Diffusive Gradients in Thin Films for measuring metal fluxes in sediment*. <https://doi.org/10.17895/ICES.PUB.5463>

Environmental Protection Agency. (2000). *Prediction of sediment toxicity using consensus-based freshwater sediment quality guidelines*. <https://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/2000JTTP.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=2000+Thru+2005&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C00thru05%5CTxt%5C00000010%5C2000JTTP.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL>

Fernández-Caliani, J. C., & Grantcharova, M. M. (2021). Enrichment and Fractionation of Rare Earth Elements in an Estuarine Marsh Soil Receiving Acid Discharges from Legacy Sulfide Mine Wastes. *Soil Systems*, 5(4), 66. <https://doi.org/10.3390/soilsystems5040066>

Gao, L., Li, R., Liang, Z., Wu, Q., Yang, Z., Li, M., Chen, J., & Hou, L. (2021). Mobilization Mechanisms and Toxicity Risk of Sediment Trace Metals (cu, Zn, Ni, and Pb) Based on Diffusive Gradients in Thin Films: A Case Study in the Xizhi River Basin, South China. *Journal of Hazardous Materials*, 410, 124590. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124590>

Gao, Y., Zhou, C., Gaulier, C., Bratkic, A., Galceran, J., Puy, J., Zhang, H., Leermakers, M., & Baeyens, W. (2019). Labile trace metal concentration measurements in marine environments: From coastal to open ocean areas. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 116, 92-101. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.027>

Gu, Y.-G. (2021). Risk assessment of eight metals and their mixtures to aquatic biota in sediments with diffusive gradients in thin films (DGT): A case study in Pearl River intertidal



zone. *Environmental Sciences Europe*, 33(1), 122. <https://doi.org/10.1186/s12302-021-00564-1>

Hooda, P. (Ed.). (2010). *Trace Elements in Soils*. Blackwell Publishing.

ISO. (2015). *ISO 11074:2015 Soil Quality-Vocabulary*. <https://www.iso.org/cms/render/live/en/sites/isoorg/contents/data/standard/05/92/59259.html>

Junta de Andalucía (2022). Buscador de Espacios Naturales. Marismas del Odiel. [https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal/web/ventanadelvisitante/detalle-buscador-mapa/-/asset\\_publisher/JlBxh2qB3NwR/content/marismas-del-odiel-10/255035](https://www.juntadeandalucia.es/medioambiente/portal/web/ventanadelvisitante/detalle-buscador-mapa/-/asset_publisher/JlBxh2qB3NwR/content/marismas-del-odiel-10/255035) (último acceso 5/4/2022).

Kraal, P., Burton, E. D., & Bush, R. T. (2013). Iron monosulfide accumulation and pyrite formation in eutrophic estuarine sediments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 122, 75-88. <https://doi.org/10.1016/j.gca.2013.08.013>

López González, N., Borrego, J., & Carro, B. (2014). *La contaminación de la Ría de Huelva*. 2.

López Julián, P. L., Mandado Collado, J. M., & Mandado Collado, J. M. (2002). Extracciones secuenciales de metales pesados. Aplicaciones en ciencias geológicas. *Estudios Geológicos*, 58(5-6), 133-144. <https://doi.org/10.3989/egeol.02585-6118>

Malvern Panalytical. (2021). *Analizador láser de tamaño de partícula Mastersizer 3000E*. <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/product-range/mastersizer-range/mastersizer-3000e>

Morillo, J., Usero, J., & Gracia, I. (2002). Partitioning of metals in sediments from the Odiel River (Spain). *Environment International*, 28(4), 263-271. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(02\)00033-8](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(02)00033-8)

Paller, M., Harmon, M., Knox, A. S., Khune, W., & Halverson, N. (2019). *Assessing effects of dissolved organic carbon and water hardness on metal toxicity to Ceriodaphnia dubia using diffusive gradients in thin films (DGT)*. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134107>

Pascual, G., Iannaccone, J., & Alvariño, L. (2019). Macroinvertebrados bentónicos y ensayos toxicológicos para evaluar la calidad del agua y del sedimento del río Rímac, Lima, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 30(4), 1421-1442. <https://doi.org/10.15381/rivep.v30i4.17164>

Quevedo, O., Gómez, J., Ramírez, C., Estrada, T., Moreno, C., Mendiguchía, C., Villanueva Tagle, M. E., & Pomares Alfonso, M. S. (2012). Estudio de la contaminación por metales en sedimentos acuáticos de la Bahía de Matanzas. *Química Nova*, 35, 924-931. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012000500012>

Rendina, A. E. (2015). *Formas geoquímicas, biodisponibilidad potencial y enriquecimiento de metales pesados en sedimentos del Río Matanza-Riachuelo en ambientes agropecuarios, urbanos e industriales de la cuenca*. Universidad de la Coruña.

Rosado, D., Usero, J., & Morillo, J. (2015). Ability of 3 extraction methods (BCR, Tessier and protease K) to estimate bioavailable metals in sediments from Huelva estuary (Southwestern Spain). *102*, 65-71. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.11.057>

Ruello, M. L., Sileno, M., Sani, D., & Fava, G. (2008). DGT use in contaminated site characterization. The importance of heavy metal site specific behaviour. *Chemosphere*, 70(6), 1135-1140. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.08.013>

Ruiz, F., González-Regalado, M. L., Borrego, J., Morales, J. A., Pendón, J. G., & Muñoz, J. M. (1998). Stratigraphic sequence, elemental concentrations and heavy metal pollution in Holocene sediments from the Tinto-Odiel Estuary, southwestern Spain. *Environmental Geology*, 34(4), 270-278. <https://doi.org/10.1007/s002540050278>

Siegel, F. (2002). *Environmental Geochemistry of Potentially Toxic Metals* (Primera). Springer.

Silveti Loeza, A., Murillo, M., González Flores, E., & Mendoza Hernández, V. (2013). *Cualidad política de la tecnología; Método BCR de extracción química secuencial para el diagnóstico de la contaminación por metales pesados.pdf*.

Simpson, S. L., & Batley, G. E. (2003). Disturbances to metal partitioning during toxicity testing of iron(II)-rich estuarine pore waters and whole sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(2), 424-432. <https://doi.org/10.1002/etc.5620220225>

*Tabla de mareas 2021 de Huelva para ir de pesca*. (s. f.). Recuperado 5 de septiembre de 2021, de <https://tablademareas.com/es/huelva/huelva>

Tokalioglu, S., Kartal, S., & Elci, L. (2000). Determination of heavy metals and their speciation in lake sediments by flame atomic absorption spectrometry after a four-stage sequential extraction procedure. 33-40.

US EPA, O. (2016a, junio 23). *Los estuarios* [Overviews and Factsheets]. <https://espanol.epa.gov/espanol/los-estuarios>

US EPA, O. (2016b, junio 23). *Los retos de los estuarios* [Overviews and Factsheets]. <https://espanol.epa.gov/espanol/los-retos-de-los-estuarios>

Valero, A., Umbría-Salinas, K., Wallner-Kersanach, M., Andrade, C. F. de, Yabe, M. J. S., Contreira-Pereira, L., Wasserman, J. C., Kuroshima, K. N., & Zhang, H. (2020). Potential availability of trace metals in sediments in southeastern and southern Brazilian shipyard areas using the DGT technique and chemical extraction methods. *Science of The Total Environment*, 710, 136216. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136216>

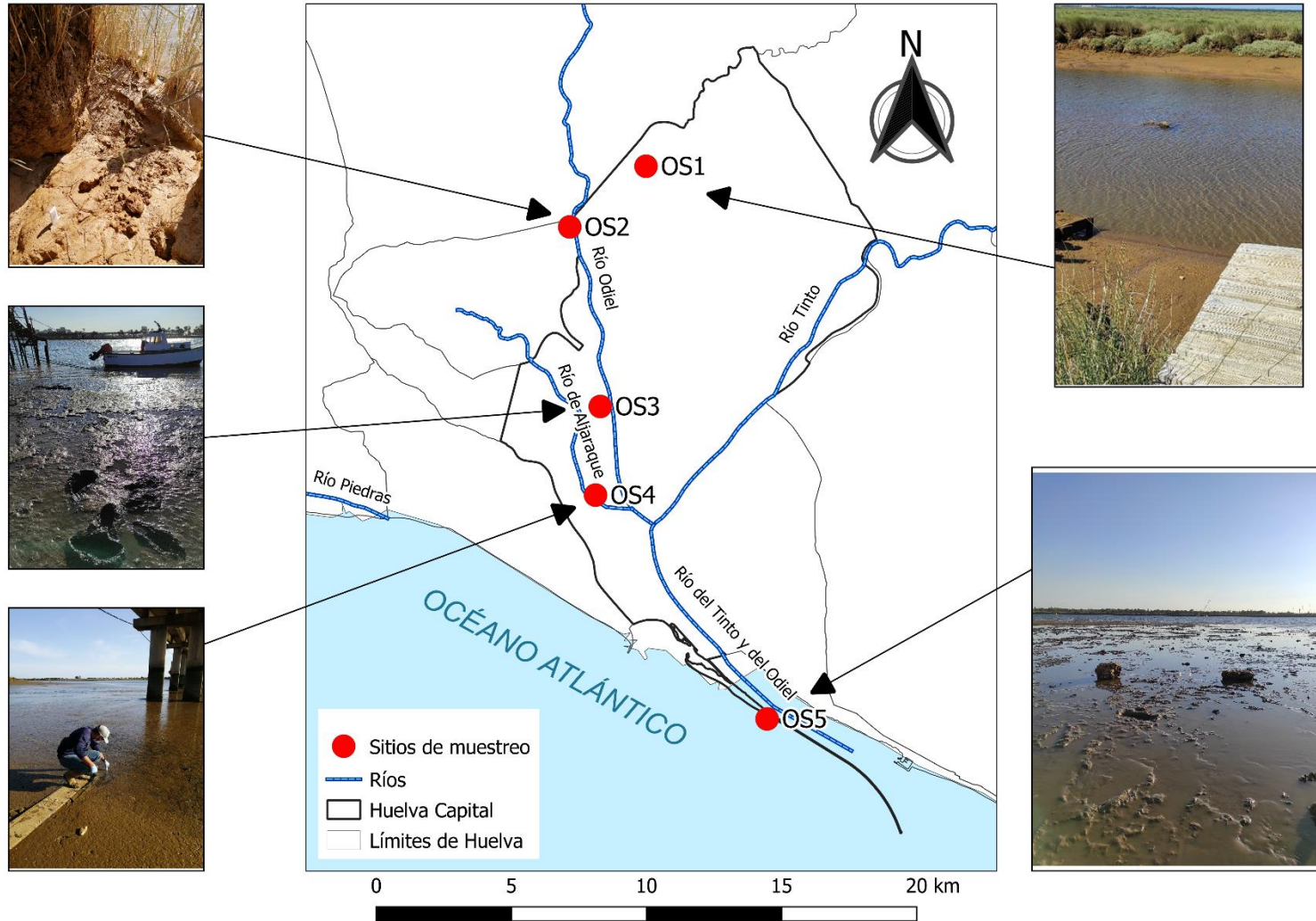
Xie, M., Simpson, S. L., Huang, J., Teasdale, P. R., & Wang, W.-X. (2021). In Situ DGT Sensing of Bioavailable Metal Fluxes to Improve Toxicity Predictions for Sediments. *Environmental Science & Technology*, 55(11), 7355-7364. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c07670>

Yuan, H., Yin, H., Yang, Z., Yu, J., Liu, E., Li, Q., Tai, Z., & Cai, Y. (2020). Diffusion kinetic process of heavy metals in lacustrine sediment assessed under different redox conditions by DGT and DIFS model. *Science of The Total Environment*, 741, 140418. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140418>

Zhang, H., & Davison, W. (2015). *Use of diffusive gradients in thin-films for studies of chemical speciation and bioavailability*. 18.

## **6. ANEXOS**

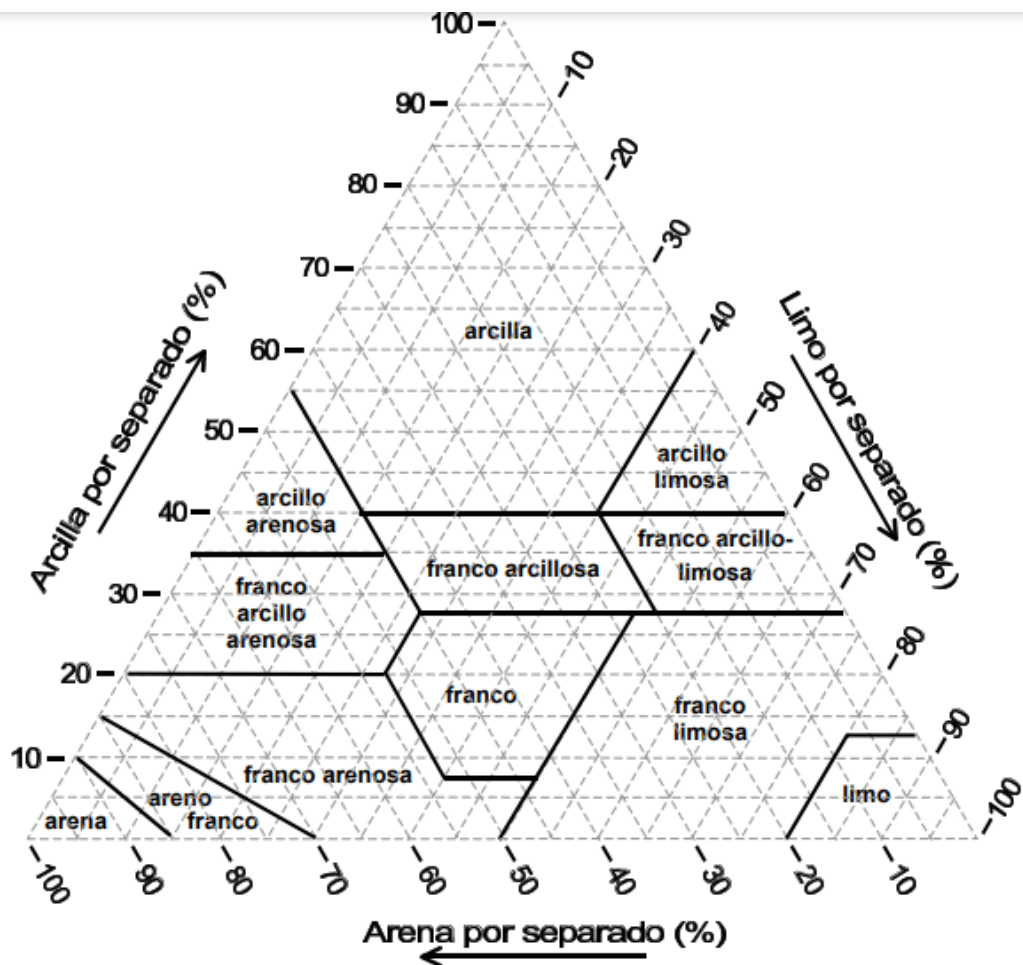
# Anexo 1: Apéndice fotográfico de puntos de muestreo



## Anexo 2: Tabla de Mareas mayo 2021 para Huelva

DÍA			MAREAS DE HUELVA					ACTIVIDAD MEDIA
			1ª MAREA	2ª MAREA	3ª MAREA	4ª MAREA	COEFICIENTE	
1 S		▲ 7:32 h ▼ 21:18 h	0:32 h -1,0 m ▼	7:24 h 0,8 m ▲	12:49 h -0,8 m ▼	19:43 h 0,9 m ▲	63 medio	➡
2 D		▲ 7:31 h ▼ 21:18 h	1:29 h -0,8 m ▼	8:21 h 0,6 m ▲	13:45 h -0,6 m ▼	20:42 h 0,7 m ▲	50 medio	➡ ➡
3 L		▲ 7:30 h ▼ 21:19 h	2:40 h -0,7 m ▼	9:33 h 0,5 m ▲	15:01 h -0,4 m ▼	21:56 h 0,6 m ▲	43 bajo	➡ ➡
4 M		▲ 7:29 h ▼ 21:20 h	4:12 h -0,6 m ▼	11:02 h 0,4 m ▲	16:36 h -0,4 m ▼	23:20 h 0,6 m ▲	44 bajo	➡
5 X		▲ 7:28 h ▼ 21:21 h	5:39 h -0,6 m ▼	12:23 h 0,4 m ▲	17:58 h -0,4 m ▼		51 medio	
6 J		▲ 7:27 h ▼ 21:22 h	0:35 h 0,6 m ▲	6:44 h -0,6 m ▼	13:23 h 0,5 m ▲	18:58 h -0,5 m ▼	59 medio	➡
7 V		▲ 7:26 h ▼ 21:23 h	1:33 h 0,7 m ▲	7:30 h -0,7 m ▼	14:09 h 0,7 m ▲	19:43 h -0,6 m ▼	67 medio	➡
8 S		▲ 7:25 h ▼ 21:24 h	2:19 h 0,8 m ▲	8:07 h -0,8 m ▼	14:48 h 0,8 m ▲	20:20 h -0,7 m ▼	73 alto	➡ ➡
9 D		▲ 7:24 h ▼ 21:25 h	2:58 h 0,8 m ▲	8:39 h -0,8 m ▼	15:22 h 0,8 m ▲	20:54 h -0,8 m ▼	78 alto	➡ ➡
10 L		▲ 7:23 h ▼ 21:26 h	3:33 h 0,9 m ▲	9:09 h -0,9 m ▼	15:53 h 0,9 m ▲	21:27 h -0,9 m ▼	80 alto	➡ ➡ ➡
11 M		▲ 7:22 h ▼ 21:26 h	4:06 h 0,9 m ▲	9:38 h -0,9 m ▼	16:24 h 0,9 m ▲	21:58 h -0,9 m ▼	80 alto	➡ ➡ ➡
12 X		▲ 7:21 h ▼ 21:27 h	4:38 h 0,9 m ▲	10:08 h -0,9 m ▼	16:53 h 0,9 m ▲	22:30 h -0,9 m ▼	78 alto	➡ ➡ ➡
13 J		▲ 7:20 h ▼ 21:28 h	5:09 h 0,8 m ▲	10:37 h -0,9 m ▼	17:23 h 0,9 m ▲	23:02 h -0,9 m ▼	74 alto	➡ ➡ ➡
14 V		▲ 7:19 h ▼ 21:29 h	5:41 h 0,8 m ▲	11:07 h -0,8 m ▼	17:54 h 0,9 m ▲	23:35 h -0,8 m ▼	69 medio	➡ ➡
15 S		▲ 7:18 h ▼ 21:30 h	6:14 h 0,7 m ▲	11:39 h -0,7 m ▼	18:27 h 0,8 m ▲		62 medio	➡
16 D		▲ 7:18 h ▼ 21:31 h	0:11 h -0,7 m ▼	6:50 h 0,6 m ▲	12:14 h -0,6 m ▼	19:05 h 0,7 m ▲	54 medio	
17 L		▲ 7:17 h ▼ 21:31 h	0:53 h -0,7 m ▼	7:33 h 0,5 m ▲	12:56 h -0,5 m ▼	19:50 h 0,6 m ▲	46 bajo	➡
18 M		▲ 7:16 h ▼ 21:32 h	1:44 h -0,6 m ▼	8:26 h 0,4 m ▲	13:52 h -0,5 m ▼	20:46 h 0,6 m ▲	42 bajo	➡ ➡
19 X		▲ 7:15 h ▼ 21:33 h	2:51 h -0,5 m ▼	9:34 h 0,4 m ▲	15:06 h -0,4 m ▼	21:57 h 0,5 m ▲	42 bajo	➡ ➡
20 J		▲ 7:15 h ▼ 21:34 h	4:10 h -0,5 m ▼	10:55 h 0,4 m ▲	16:30 h -0,4 m ▼	23:14 h 0,6 m ▲	50 medio	➡ ➡
21 V		▲ 7:14 h ▼ 21:35 h	5:23 h -0,6 m ▼	12:08 h 0,5 m ▲	17:42 h -0,5 m ▼		61 medio	
22 S		▲ 7:13 h ▼ 21:36 h	0:24 h 0,7 m ▲	6:24 h -0,7 m ▼	13:07 h 0,7 m ▲	18:42 h -0,7 m ▼	75 alto	➡
23 D		▲ 7:13 h ▼ 21:36 h	1:23 h 0,8 m ▲	7:16 h -0,9 m ▼	13:58 h 0,8 m ▲	19:33 h -0,8 m ▼	87 alto	➡
24 L		▲ 7:12 h ▼ 21:37 h	2:16 h 1,0 m ▲	8:03 h -1,0 m ▼	14:45 h 1,0 m ▲	20:22 h -1,0 m ▼	97 muy alto	➡
25 M		▲ 7:12 h ▼ 21:38 h	3:05 h 1,1 m ▲	8:47 h -1,1 m ▼	15:31 h 1,1 m ▲	21:08 h -1,1 m ▼	102 muy alto	➡ ➡
26 X		▲ 7:11 h ▼ 21:39 h	3:54 h 1,1 m ▲	9:31 h -1,2 m ▼	16:17 h 1,2 m ▲	21:55 h -1,2 m ▼	102 muy alto	➡ ➡ ➡
27 J		▲ 7:11 h ▼ 21:39 h	4:42 h 1,1 m ▲	10:15 h -1,1 m ▼	17:03 h 1,2 m ▲	22:43 h -1,2 m ▼	97 muy alto	➡ ➡ ➡
28 V		▲ 7:10 h ▼ 21:40 h	5:31 h 1,1 m ▲	11:00 h -1,1 m ▼	17:50 h 1,2 m ▲	23:32 h -1,1 m ▼	88 alto	➡
29 S		▲ 7:10 h ▼ 21:41 h	6:21 h 1,0 m ▲	11:47 h -0,9 m ▼	18:39 h 1,1 m ▲		77 alto	
30 D		▲ 7:09 h ▼ 21:41 h	0:24 h -1,0 m ▼	7:13 h 0,8 m ▲	12:37 h -0,8 m ▼	19:31 h 0,9 m ▲	65 medio	➡
31 L		▲ 7:09 h ▼ 21:42 h	1:21 h -0,8 m ▼	8:09 h 0,6 m ▲	13:33 h -0,6 m ▼	20:27 h 0,8 m ▲	55 medio	➡ ➡

Anexo 3: Triángulo textural USDA



#### Anexo 4: Tabla de resultados de granulometría

Punto	Profund. (cm)	Nomenclatura	Arcilla (%)	Limo (%)	Arena (%)	Textura
OS1	3	OS1-0-3	4.1	62.9	33.0	Franco limoso
OS1	6	OS1-3-6	4.1	57.4	38.5	Franco limoso
OS1	9	OS1-6-9	4.8	65.0	30.2	Franco limoso
OS1	12	OS1-9-12	5.2	73.1	21.7	Franco limoso
OS1	15	OS1-12-15	5.6	71.7	22.8	Franco limoso
OS2	3	OS2-0-3	3.3	63.4	33.3	Franco limoso
OS2	6	OS2-3-6	3.8	59.8	36.4	Franco limoso
OS2	9	OS2-6-9	7.4	73.7	18.9	Franco limoso
OS2	12	OS2-9-12	4.5	55.4	40.1	Franco limoso
OS2	15	OS2-12-15	5.6	63.3	31.1	Franco limoso
OS3	3	OS3-0-3	2.6	45.7	51.7	Franco arenoso
OS3	6	OS3-3-6	5.7	71.2	23.1	Franco limoso
OS3	9	OS3-6-9	7.6	77.5	14.8	Franco limoso
OS3	12	OS3-9-12	7.3	66.9	25.8	Franco limoso
OS3	15	OS3-12-15	5.9	61.1	33.0	Franco limoso
OS4	3	OS4-0-3	4.5	65.5	30.0	Franco limoso
OS4	6	OS4-3-6	5.4	73.2	21.4	Franco limoso
OS4	9	OS4-6-9	7.6	80.2	12.3	Limoso
OS4	12	OS4-9-12	3.4	48.1	48.5	Franco arenoso
OS4	15	OS4-12-15	4.5	55.8	39.7	Franco limoso
OS5	3	OS5-0-3	2.9	37.1	60.0	Franco arenoso
OS5	6	OS5-3-6	3.5	41.9	54.5	Franco arenoso
OS5	9	OS5-6-9	4.7	55.5	39.8	Franco limoso
OS5	12	OS5-9-12	3.1	35.5	61.4	Franco arenoso
OS5	15	OS5-12-15	2.6	29.7	67.7	Franco arenoso

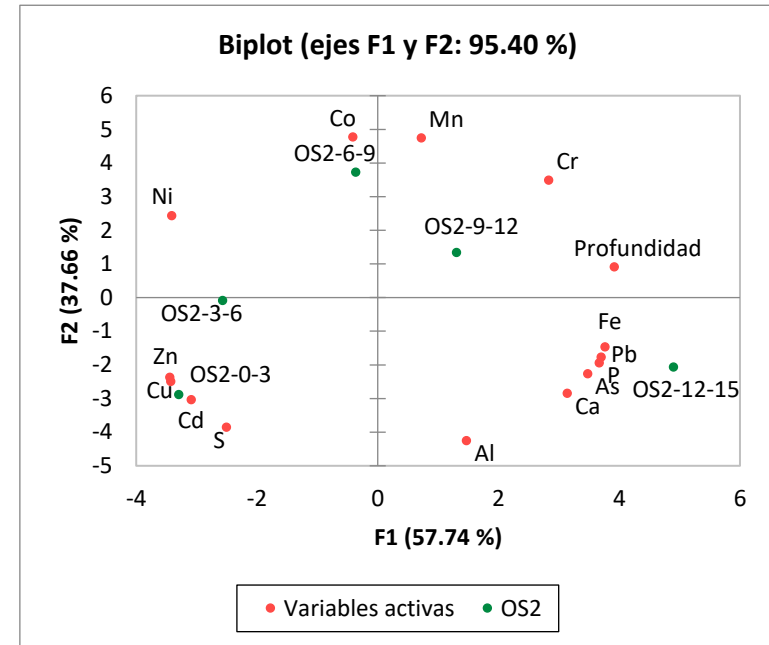
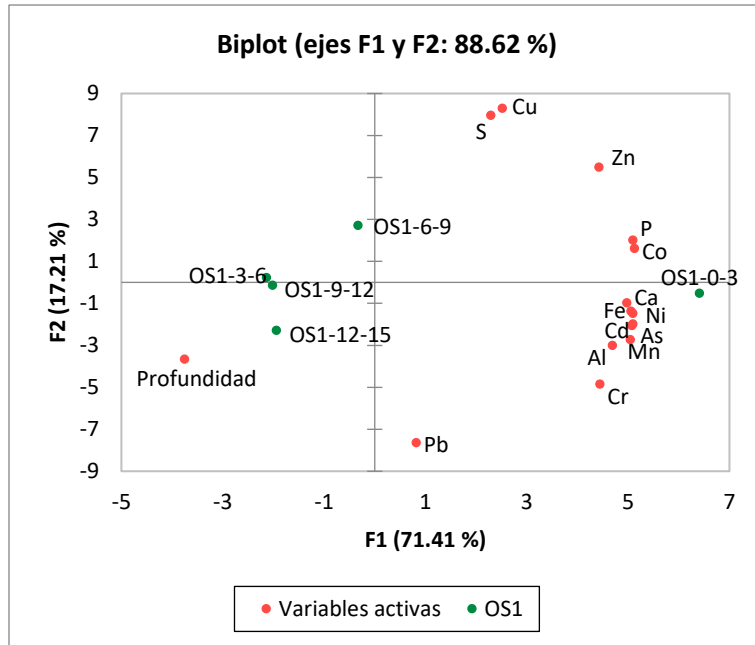


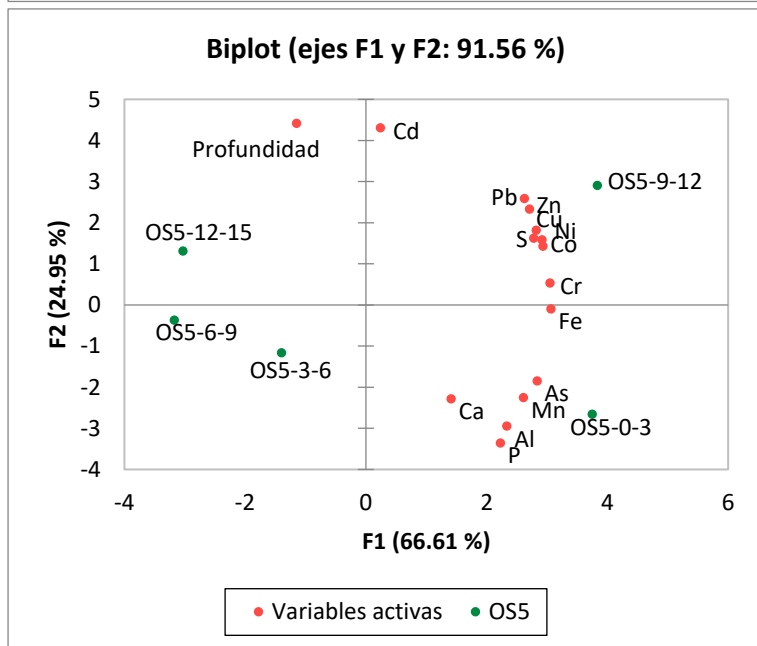
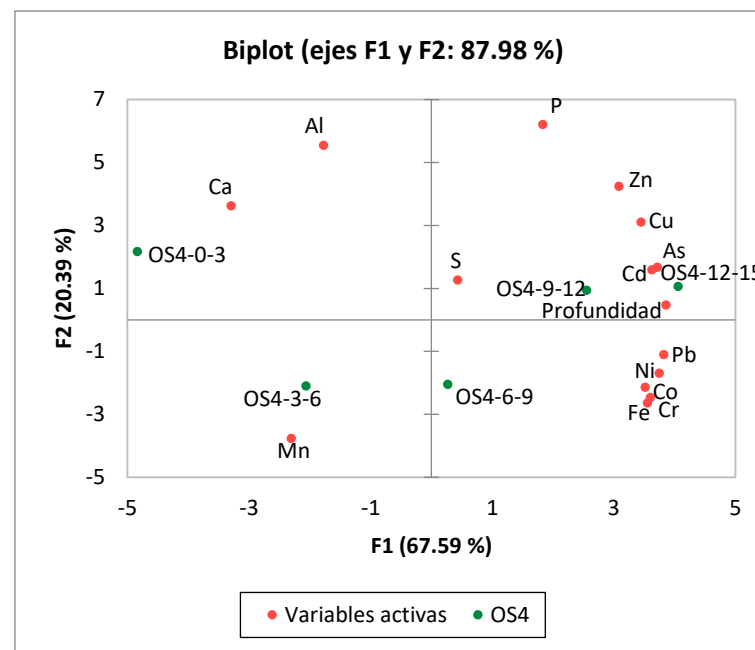
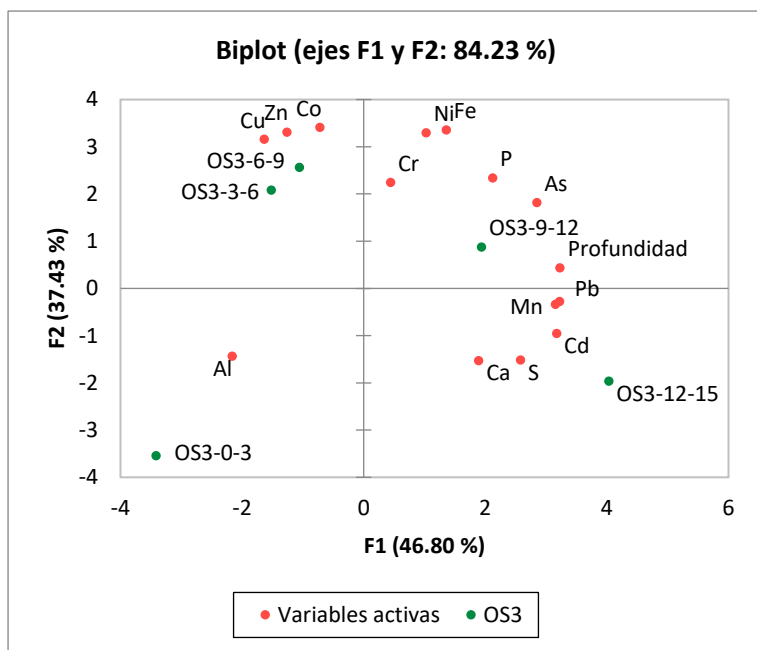
**Anexo 5: Tabla de resultados de concentraciones totales de metales en sedimentos**

Metal	Punto	No. de observaciones	Mínimo	Máximo	Mediana	Media	Desviación típica (n-1)
Al	OS1	5	33484.0	77074.9	38725.8	47039.1	17570.2
	OS2	5	26198.4	41668.4	33809.3	34078.5	6975.2
	OS3	5	30871.0	46444.5	33047.6	36902.4	7056.5
	OS4	5	20600.4	52954.3	36871.7	37480.4	11606.6
	OS5	5	12677.1	18874.6	15001.1	15110.5	2417.5
Cr	OS1	5	59.0	100.3	72.0	75.0	16.0
	OS2	5	49.7	72.4	69.7	65.0	9.6
	OS3	5	73.4	89.6	81.5	80.4	6.5
	OS4	5	83.3	93.0	90.5	89.5	3.7
	OS5	5	12.7	22.2	14.2	16.7	4.6
Mn	OS1	5	245.8	510.7	269.9	312.6	111.7
	OS2	5	221.8	2315.7	673.7	1031.3	823.3
	OS3	5	390.0	556.7	425.3	464.5	79.4
	OS4	5	429.8	491.9	439.5	448.5	25.4
	OS5	5	103.9	230.2	151.3	163.4	46.6
Fe	OS1	5	63656.4	103519.4	68746.7	75138.3	16127.4
	OS2	5	50899.6	128810.9	60568.4	74924.7	31324.0
	OS3	5	56134.7	65409.9	64455.8	62630.1	3863.3
	OS4	5	66189.5	73764.9	71816.8	71036.2	2871.3
	OS5	5	10004.8	16520.6	12210.2	13093.8	3219.9
Co	OS1	5	20.7	43.2	22.1	27.5	9.6
	OS2	5	23.7	76.1	36.2	40.7	21.4
	OS3	5	33.1	39.6	37.8	36.5	2.9
	OS4	5	37.4	41.1	39.8	39.6	1.4
	OS5	5	5.5	9.9	5.8	7.0	2.0
Ni	OS1	5	27.4	51.1	33.7	35.4	9.1
	OS2	5	19.8	39.1	32.5	31.8	7.4
	OS3	5	34.5	40.1	38.3	38.2	2.2
	OS4	5	37.1	43.0	41.9	40.9	2.4
	OS5	5	4.9	8.8	5.6	6.4	1.6
Cu	OS1	5	1211.1	3013.4	2059.0	2023.5	746.0
	OS2	5	1372.3	2459.2	1483.6	1820.1	545.2
	OS3	5	1006.5	1648.8	1441.7	1392.3	269.8
	OS4	5	1593.5	1962.6	1674.1	1740.5	156.4
	OS5	5	184.3	378.8	214.2	250.9	82.1
Zn	OS1	5	909.0	2758.8	1417.1	1702.9	800.1
	OS2	5	537.2	2402.1	847.3	1208.7	766.8
	OS3	5	1569.5	2219.3	1981.4	1915.9	270.6
	OS4	5	2217.3	2587.4	2330.4	2388.3	149.4
	OS5	5	269.3	487.8	325.2	355.2	86.2

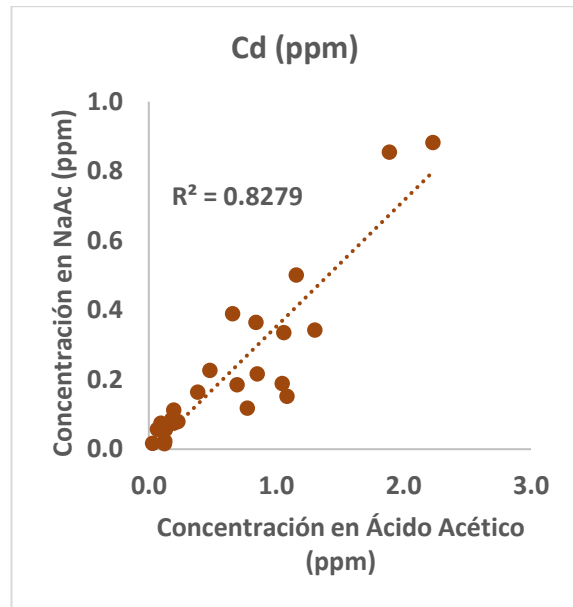
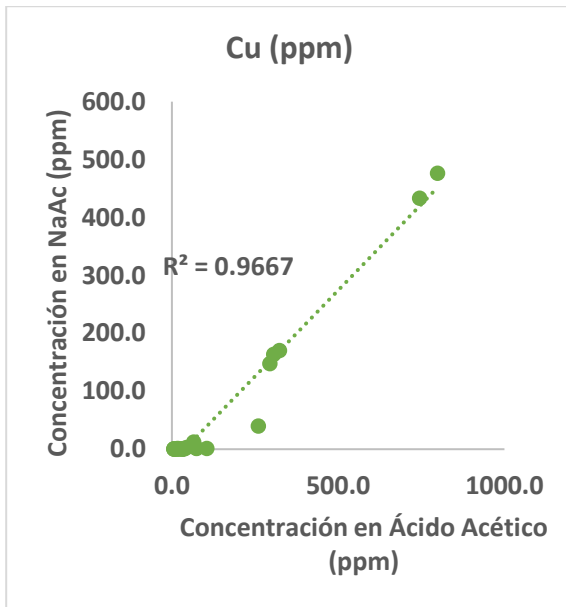
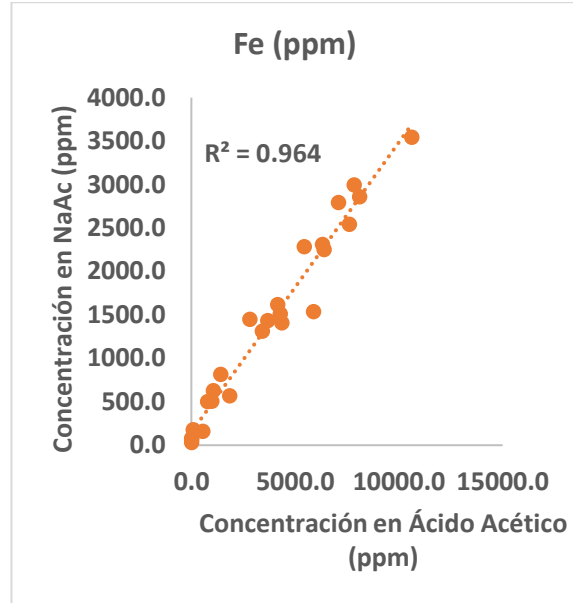
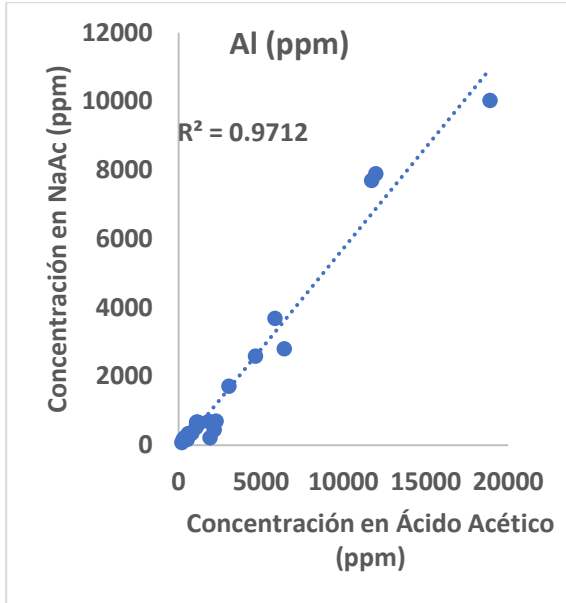
Metal	Punto	No. de observaciones	Mínimo	Máximo	Mediana	Media	Desviación típica (n-1)
As	OS1	5	232.3	433.5	270.1	292.6	81.0
	OS2	5	161.4	1538.9	249.7	517.8	576.9
	OS3	5	187.5	265.3	249.5	239.5	31.8
	OS4	5	271.1	305.3	287.5	288.3	16.6
	OS5	5	25.0	58.9	32.9	37.6	14.0
Cd	OS1	5	0.6	2.0	0.8	1.0	0.6
	OS2	5	0.4	1.3	0.5	0.8	0.5
	OS3	5	2.4	5.1	2.7	3.3	1.2
	OS4	5	1.3	2.3	1.6	1.8	0.5
	OS5	5	0.1	0.3	0.2	0.2	0.1
Pb	OS1	5	280.3	593.8	345.8	400.4	122.5
	OS2	5	228.2	695.6	277.7	363.2	194.7
	OS3	5	338.0	516.9	395.0	410.7	68.7
	OS4	5	416.7	522.1	485.1	479.5	40.9
	OS5	5	52.6	106.4	59.7	70.6	21.7

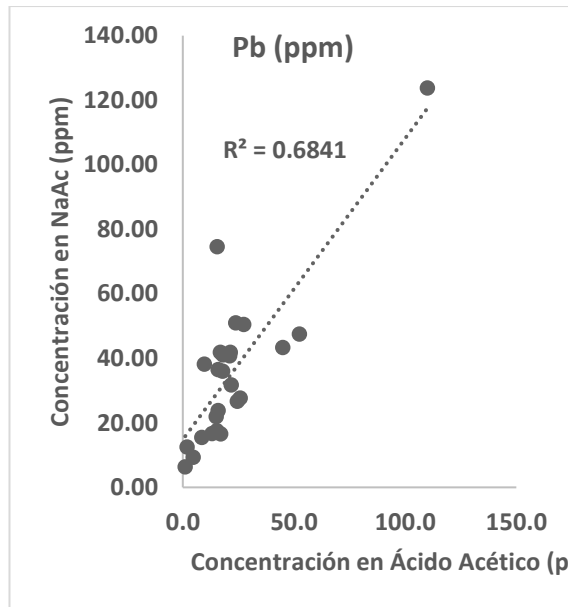
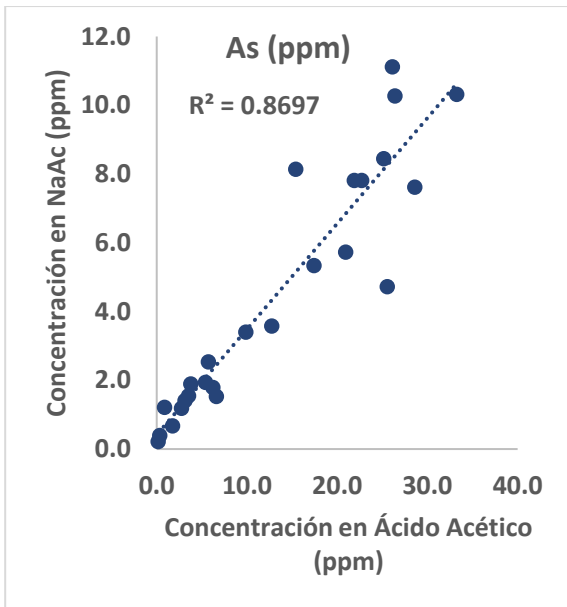
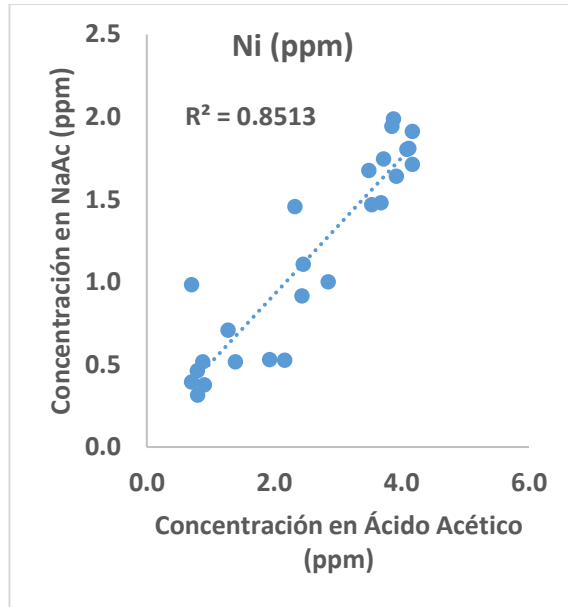
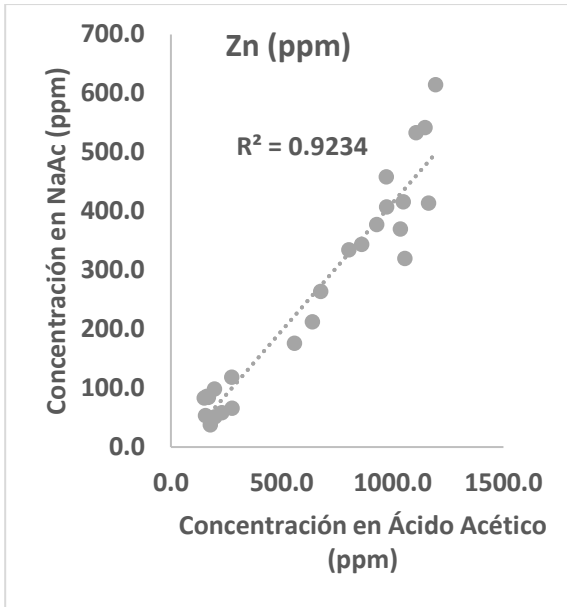
## Anexo 6: Gráficos ACP agrupados por punto de muestreo





## Anexo 7: Gráficos correlación de BCR y F2 Tessier





## Anexo 8: Resultados P-valor para pruebas de normalidad

H<sub>0</sub>: Las concentraciones detectadas de Me siguen una distribución normal.

H<sub>a</sub>: Las concentraciones detectadas de Me No siguen una distribución normal.

Punto/Variable	Al 12h	Mn 12h	Fe 12h	Ni 12h	Cu 12h	Zn 12h	As 12h	Cd 12h	Pb 12h
OS1	0.20	0.49	<b>0.01*</b>	0.27	<b>0.01*</b>	0.13	<b>0.02*</b>	0.05	<b>0.03*</b>
OS2	0.37	0.47	0.18	0.26	<b>0.02*</b>	0.16	0.09	0.12	0.64
OS3	1.00	0.55	0.12	0.78	0.98	0.44	0.42	0.71	0.83
OS4	0.19	0.40	0.13	0.13	0.17	0.12	0.48	<b>0.05*</b>	0.21
OS5	0.15	0.17	0.51	<b>0.00*</b>	0.32	0.60	0.35	0.98	0.64

\*No superan el nivel de significancia; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula

Nivel de significación alfa=0.05

Punto/Variable	Al 24h	Mn 24h	Fe 24h	Ni 24h	Cu 24h	Zn 24h	As 24h	Cd 24h	Pb 24h
OS1	0.18	0.85	<b>0.00*</b>	0.99	0.42	0.45	0.40	0.29	0.08
OS2	0.16	0.45	<b>0.03*</b>	0.06	0.28	0.13	<b>0.02*</b>	0.31	0.34
OS3	0.30	0.38	0.91	<b>0.00*</b>	0.22	0.38	0.85	<b>0.01*</b>	0.14
OS4	0.59	0.33	0.27	0.61	0.28	0.55	0.79	<b>0.02*</b>	0.40
OS5	0.73	0.26	0.06	0.49	0.34	0.97	0.36	0.15	0.48

\*No superan el nivel de significancia; por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula

Nivel de significación alfa=0.05