UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE MADRID
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
DE MINAS Y ENERGÍA

Acumulación de metales pesados en *Typha domingensis*
en la comarca minera de Almadén y adaptación de
métodos analíticos para la especiación de mercurio en
especies vegetales

TESIS DOCTORAL

Miguel Ángel Lominchar Izquierdo

Licenciado en Ciencias Ambientales

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA QUÍMICA Y COMBUSTIBLES
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS DE
MINAS Y ENERGÍA

Acumulación de metales pesados en *Typha domingensis* en la
comarca minera de Almadén y adaptación de métodos analíticos
para la especiación de mercurio en especies vegetales

TESIS DOCTORAL

Autor:

Miguel Ángel Lominchar Izquierdo

Licenciado en Ciencias Ambientales

Directores:

Rocío Millán Gómez. Doctora en Ciencias Químicas

María José Sierra Herráiz. Doctora en Química Agrícola

Tesis incluida en el programa de doctorado del Máster de Investigación,
Modelización y Análisis del Riesgo en el Medio Ambiente (RD 1393/2007)

2017

A Loli

AGRADECIMIENTOS

Por fin ha llegado el momento de escribir los agradecimientos, momento que he soñado y pensado muchas veces de cómo lo haría, de si sería capaz de poder expresar todo mi agradecimiento a todas las personas que me han acompañado a lo largo de estos años de tesis. Y, aunque dudo que en palabras pueda reflejar todo las ideas que me viene a la cabeza, intentaré hacerlo de la mejor manera posible.

En primer lugar quisiera agradecer a mis directoras de tesis su apoyo, gracias al cual este trabajo no habría salido adelante. A Rocío, por creer en mí desde el primer momento y luchar para que todo saliera bien pese a que corren tiempos difíciles para la ciencia. Y a María José, por enseñarme tanto y preocuparse por mí, no sólo a nivel laboral sino también personal, llegando a convertirse en una gran amiga.

A mi tutor de tesis, Eduardo, por estar siempre dispuesto a escucharme y ofrecerme siempre la ayuda que necesitaba.

A Rosa, por abrirme las puertas de su laboratorio sin dudarle desde la primera vez que hablamos, y por darme todas las facilidades posibles para conseguir de este modo que la especiación de mercurio en plantas se haya convertido en una realidad. Y a María, por ser mi “hada madrina”, por enseñarme todo lo que sé sobre especiación y por tener siempre una sonrisa aunque el día pintase complicado.

A mi compañero de despacho/laboratorio Javi, por volcarse tanto por el desarrollo de mi tesis como si hubiese sido la suya, esa ayuda y los mil momentos inolvidables que hemos vivido juntos siempre los llevo conmigo. A Manolillo, porque tiene un corazón que no le cabe en el pecho y hablar con él es siempre aprender algo nuevo. A Ro, por su dulzura, su expresividad y esa confidencialidad que sólo existe entre becarios. A Marga, por hacer de su despacho un lugar donde reflexionar y recurrir en caso de necesitar consejo. Al resto de los integrantes que conforman el CIEMAT, un grupo que considero como una familia, la cual es única y hace que te sientas como uno más desde el primer día que atraviesas sus puertas: Nerea, Julio, José Manuel, Raúl, Olga, Laura, Juanito, María Luisa, Thomas, Marta, Javi, Nely, Carlos y José.

A mis nuevos compañeros de trabajo en la UCM: Aurora, Fernando, Lucía, Carmen, David, Sergio y Arturo, por animarme a dar ya el último empujón que le faltaba a esta tesis.

A Casandra, por ser la persona que siempre ha estado ahí desde que éramos chiquititos, no tengo palabras para definirla ya que llamarla amiga es quedarme corto. Al resto de los “Fashion Victims”: Olga, Laura, Eva y Victor, porque por más que pase el tiempo seguimos con la misma energía y diversión que desde pequeños.

A Guillermo, por su gran amistad, bondad, y el saber que siempre está dispuesto a ayudarme en todo momento pese a que en ocasiones haya distancia de por medio. A Juan Diego, esa alma gemela con la que con una simple mirada somos capaces de decirnos todo. A Adolfo, esa cabecita loca que revoluciona allá por donde va. A Lucía, que es capaz de perder todo menos su cariño. A Cris, y nuestras aventuras piratas. Y al resto de los ambientólogos, por ser cada uno tan únicos.

A la que ha sido, es y será mi segunda familia: Iris, Jairo, Dario y Sandra. Vosotros me habéis cuidado y visto crecer a lo largo de los años y es mucho lo que os debo por todo el cariño que me habéis dado.

A la gente del máster de residuos, que, pese a estar la mayoría en la lejanía, se sienten muy cerca.

A Nieves y Amaia por su gran apoyo y por compartir todas las experiencias que conlleva realizar una tesis.

A mis compañeros de pisos: A Jorge y Estefi, de los que aprendí que siempre hay que luchar por tus sueños. Y a Noe, por su inconformismo y reflexión por las reglas establecidas, su actitud debería ser un referente para muchos.

A aquellas personas que ya no están entre nosotros, pero que seguro estarían orgullosas de ver que este momento ha llegado.

Al resto de personas que, aunque no hayan sido nombradas directamente, he tenido el placer de coincidir con ellas llenando mi vida de experiencias.

Y por último, quisiera dar las gracias a Juanma, por su dedicación, su amor sin límites, y por conseguir sacarme una sonrisa en cada momento.

Y por supuesto a mis padres, por apoyarme siempre en todas las decisiones que he tomado a lo largo de mi vida y dedicar todos sus esfuerzos en mi desarrollo tanto personal como profesional. Y a mi hermana, porque siempre será mi ejemplo a seguir, su tenacidad es digna de admiración y bien sabe ella que “*amat victoria curam*” posee un gran sentido.

A todos vosotros.

Gracias.

PREÁMBULO

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado con la financiación de las Becas para Formación de Personal Investigador publicadas en el BOE nº 237 del 30 de septiembre de 2010 otorgadas por el Ministerio de Economía y Competitividad, entonces Ministerio de Ciencia e Innovación. El trabajo desarrollado durante este periodo ha sido realizado en el Ciemat bajo la supervisión y dirección de las Doctoras Rocío Millán Gómez y María José Sierra Herráiz.

Como resultado de dicho trabajo, se han llevado a cabo las siguientes publicaciones científicas en revistas internacionales:

- **M.A. Lominchar**, M.J. Sierra, R. Millán. 2015. "Accumulation of mercury in *Typha domingensis* under field conditions". Chemosphere, 119, pp 994 – 999.
- R. Millán, **M.A. Lominchar**, J. Rodríguez-Alonso, T. Schmid, M.J. Sierra. 2014. "Riparian vegetation role in mercury uptake (Valdeazogues River, Almadén, Spain)". Journal of Geochemical Exploration, 140, pp 104 – 110.
- R. Millán, **M.A. Lominchar**, I. López-Tejedor, J. Rodríguez-Alonso, T. Schmid, M.J. Sierra. 2012. "Behaviour of mercury in soils from the Valdeazogues riverbank and transfer to *Nerium oleander* L." Journal of Geochemical Exploration, 123, pp 136 – 142.

Además, se han publicado los siguientes trabajos en congresos nacionales e internacionales:

- "Mercury species accumulation and distribution in *Typha domingensis* under real field conditions". M. Jiménez Moreno, **M.A. Lominchar**, M.J. Sierra, R. Millán, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios. Presentación oral en: Energy and Environment Knowledge Week 2016. París (Francia). 28 – 29 de octubre de 2016.
- "Development and validation of a method for mercury speciation analysis in rice and aquatic plants". R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, M. Jiménez Moreno, **M.A. Lominchar**, M.J. Sierra, R. Millán. Presentación oral en: XVIII European Conference on Analytical Chemistry (Euroanalysis). Burdeos (Francia). 6 – 10 de septiembre de 2015.
- "First insights into mercury speciation in aquatic plants using coupled techniques based on gas chromatography and atomic fluorescence detection". M. Jiménez-Moreno, **M.A. Lominchar**, M.J. Sierra, R. Millán, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios. Presentación oral en: XXIV Reunión Nacional y VIII Congreso Ibérico de espectroscopia. Logroño (España). 9 – 11 de julio de 2014.
- "Accumulation of lead, zinc and copper in different organs of *Typha domingensis* grown in an abandoned mining area". **M.A. Lominchar**, R. Millán, M.J. Sierra. Presentación oral en: 24th SETAC Europe Annual Meeting. Basilea (Suiza). 11 – 15 de mayo de 2014.
- "Distribution of mercury in sediments and its accumulation in two macrophytes under field conditions". **M.A. Lominchar**, L. Bueno, J. Rodríguez-Alonso, T. Schmid, M. Lacal, M. J. Sierra, R. Millán. Presentación de póster en: 11th International Conference on Mercury as a Global Pollutant – ICMGP. Edimburgo (Reino Unido). 28 de julio – 2 de agosto de 2013.
- "Bioacumulación de mercurio en organismos acuáticos de Almadén (Ciudad Real, España)". M. Lacal, **M.A. Lominchar**, E. García-Ordiales, M.J. Sierra, J. Rodríguez-Alonso, R. Giaggio, S. Díez, J. Loredó, R. Millán. Presentación de póster en: 9th Iberian and 6th Iberoamerican Congress on Environmental Contamination and Toxicology. Valencia (España). 1 – 4 de julio de 2013.
- "Can riparian vegetation be used in phytotechnologies applied to mining districts?". **M.A. Lominchar**, E. García-Ordiales, L. Bueno, J. Rodríguez-Alonso, M. Lacal, M. J. Sierra, J. Loredó, R. Millán. Presentación oral en: 23rd SETAC Europe Annual Meeting. Glasgow (Reino Unido). 12 – 16 de mayo de 2013.
- "Influencia de la minería en la transferencia de metales a la vegetación de ribera". **M.A. Lominchar**. Presentación oral en: Jornada anual del programa EIADES. Alcalá de Henares (España). 13 de diciembre de 2012.

- “*Study of mercury accumulation in Typha domingensis (Pers.) in the Valdeazogues River basin (Almadén – Spain)*” **M.A. Lominchar**, E. García-Ordiales, J. Rodríguez-Alonso, M.J. Sierra, T. Schmid, J. Loredó, R. Millán. Presentación de póster en: 4th International Congress of the European Soil Science Societies – Eurosoil. Bari (Italia). 2 – 6 de Julio de 2012.
- “*Mercury distribution in soils of the Valdeazogues riverbanks and transfer to Nerium oleander shrubs*”. R. Millán, **M.A. Lominchar**, I. López-Tejedor, J. Rodríguez-Alonso, T. Schmid, M.J. Sierra. Presentación de póster en: 10th International Conference on Mercury as a Global Pollutant – ICMGP. Halifax (Canadá). 24 – 29 de julio de 2011.
- “*Behaviour and distribution of mercury in soil samples collected from Valdeazogues River (Ciudad Real, Spain)*”. R. Millán, **M.A. Lominchar**, M.J. Sierra, J. Rodríguez-Alonso. Presentación de póster en: 21st SETAC Europe Annual Meeting. Milán (Italia). 15 – 19 de mayo de 2011.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Agradecimientos	I
Preámbulo	V
Índice de contenidos	IX
Índice de figuras	XIII
Índice de tablas	XV
Resumen / Abstract	XIX
Capítulo I: Introducción.....	1
1.1. La explotación de metales y el distrito minero de Almadén	1
1.1.1. Geología	3
1.1.2. Suelos.....	4
1.1.3. Climatología	5
1.1.4. Redes hidrográficas.....	6
1.1.5. Fauna	6
1.1.6. Flora.....	7
1.2. Los metales pesados	7
1.2.1. Cinc.....	8
1.2.1.1. Antecedentes históricos del cinc.....	8
1.2.1.2. Propiedades fisicoquímicas del cinc.....	8
1.2.1.3. Déficit y toxicidad del cinc en humanos	8
1.2.1.4. Déficit y toxicidad del cinc en plantas.....	9
1.2.2. Cobre	10
1.2.2.1. Antecedentes históricos del cobre.....	10
1.2.2.2. Propiedades fisicoquímicas del cobre.....	10
1.2.2.3. Déficit y toxicidad del cobre en humanos.....	10
1.2.2.4. Déficit y toxicidad del cobre en plantas	11
1.2.3. Plomo	12
1.2.3.1. Antecedentes históricos del plomo.....	12
1.2.3.2. Propiedades fisicoquímicas del plomo.....	12
1.2.3.3. Déficit y toxicidad del plomo en humanos.....	12
1.2.3.4. Déficit y toxicidad del plomo en plantas.....	13
1.2.4. Mercurio	14
1.2.4.1. Antecedentes históricos del mercurio	14
1.2.4.2. Propiedades fisicoquímicas del plomo.....	15
1.2.4.3. Toxicidad del mercurio en humanos.....	15
1.2.4.4. Toxicidad del mercurio en plantas.....	17
1.3. Especiación del mercurio	17

1.3.1. Extracción de especies de mercurio	18
1.3.1.1. Extracción ácida	18
1.3.1.2. Extracción alcalina	19
1.3.1.3. Destilación o volatilización ácida	19
1.3.1.4. Extracción con fluidos supercríticos	19
1.3.2. Preconcentración de las especies de mercurio	19
1.3.2.1. Extracción líquido-líquido (LLE)	19
1.3.2.2. Atrapamiento criogénico	19
1.3.2.3. Extracción en fase sólida	19
1.3.2.4. Microextracción en fase sólida	20
1.3.3. Derivatización	20
1.3.4. Técnicas cromatográficas para separación de las especies de mercurio	20
1.3.4.1. Cromatografía de gases	21
1.3.4.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	21
1.3.5. Sistemas de detección de especies de mercurio	21
1.4. Técnicas de descontaminación de emplazamientos contaminados	21
1.4.1. Técnicas biológicas: Fitotecnologías	23
1.4.2. Uso de macrófitas en las fitotecnologías	25
1.4.2.1. Descripción de la planta de estudio: <i>Typha domingensis</i> Pers	26
1.5. Objetivos.....	27
Capítulo II: Materiales y métodos	29
2.1. Materiales y métodos para la evaluación de la acumulación de metales pesados en <i>Typha domingensis</i>	29
2.1.1. Selección de los puntos de muestreo	29
2.1.2. Acondicionamiento de muestras de sedimentos y medición de parámetros físicoquímicos.....	31
2.1.2.1. Caracterización físicoquímica	32
2.1.2.2. Molienda y digestión de muestras de sedimento	32
2.1.3. Extracción secuencial	32
2.1.4. Acondicionamiento de muestras de planta	33
2.1.5. Cuantificación de la concentración de Hg total en las muestras de planta, sedimento y extracción secuencial	34
2.1.6. Cuantificación de la concentración de Pb, Zn y Cu total en las muestras de planta, sedimento y extracción secuencial	34
2.1.7. Análisis estadístico	35
2.2. Materiales y métodos para la optimización del método analítico de especiación de mercurio en plantas	35
2.2.1. Limpieza de material	35
2.2.2. Preparación de las muestras para la especiación de mercurio	36

2.2.3. Procedimientos del método de especiación de mercurio	36
2.2.3.1. Extracción	37
2.2.3.2. Derivatización	38
2.2.3.3. Limpieza	38
2.2.3.4. Preconcentración	38
2.2.3.5. Medición	38
2.2.3.5.1. Cuantificación de la señal cromatográfica	40
Capítulo III: Resultados y discusión	43
3.1. Estudio de la acumulación de metales en <i>Typha domingensis</i> en el distrito minero de Almadén	43
3.1.1. Sedimentos	43
3.1.1.1. Caracterización fisicoquímica de sedimentos.....	43
3.1.1.2. Concentración total de metales	46
3.1.1.3. Extracciones secuenciales	49
3.1.2. Acumulación de metales pesados en <i>Typha domingensis</i>	51
3.1.2.1. Comparativa de niveles de concentración en estudios anteriores del género <i>Typha</i>	57
3.1.2.2. Comparativa de perfiles de acumulación	59
3.2. Eficiencia de la acumulación de metales pesados en <i>Typha domingensis</i>	60
3.2.1. Factor de translocación	60
3.2.2. Factor de bioacumulación (BAF)	61
3.2.3. Umbral de hiperacumulación	62
3.2.4. Cantidad de metal extraído – Estudio de biomasa	63
3.2.4.1. Diseño de muestreo y obtención de datos	64
3.2.4.2. Creación del modelo de biomasa	64
3.2.4.3. Aproximación de cantidad de metal extraído por fitoextracción utilizando el modelo matemático	69
3.2.5. Evaluación de <i>T. domingensis</i> para su uso en fitotecnología	70
3.3. Relación de la acumulación de metales pesados en <i>Typha domingensis</i> con el sedimento.....	70
3.4. Especiación de mercurio en muestras de planta por GC-pyro-AFS.....	72
3.4.1. Comprobación de la capacidad de extracción y medición de los métodos originales	72
3.4.2. Modificación de las condiciones de derivatización y etilación	72
3.4.3. Optimización de extracción de metilmercurio con TMAH como agente extractante.....	73
3.4.4. Optimización de extracción de metilmercurio con HNO ₃ como agente extractante.....	74
3.4.5. Estudio para el aumento de la cantidad de muestra añadida.....	76
3.4.6. Validación de los métodos mediante materiales certificados de referencia.....	76
3.4.7. Comparación con otros métodos utilizados en la extracción de metilmercurio en plantas	78
3.4.8. Especiación de mercurio en <i>T. domingensis</i> en la Comarca Minera de Almadén	82

Capítulo IV: Conclusiones	87
Capítulo V: Bibliografía	91
Anexos	105
<i>Anexo I: Etapas de la Extracción Secuencial SEP CIEMAT (Sánchez et al., 2005) .....</i>	<i>105</i>
<i>Anexo II: Valores de concentración de los CRMs utilizados .....</i>	<i>106</i>
<i>Anexo III: Tablas resumen de datos .....</i>	<i>107</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1:</i> Localización del distrito minero de Almadén	2
<i>Figura 2:</i> Mapa geológico del área circundante al sinclinal de Almadén	3
<i>Figura 3:</i> Mapa geológico del sinclinal de Almadén (Palero-Fernández et al. 2015)	3
<i>Figura 4:</i> Mapa esquemático en el que se representan los principales relieves de la comarca minera de Almadén	4
<i>Figuras 5:</i> Temperaturas y precipitaciones media de la estación meteorológica de mina de Almadén ...	5
<i>Figura 6:</i> Temperaturas y precipitaciones media de la estación meteorológica del pueblo de Fontanosas	6
<i>Figura 7:</i> Diagrama Eh-pH del cinc	8
<i>Figura 8:</i> Esquema de efectos del exceso de Zn en planta	9
<i>Figura 9:</i> Diagrama Eh-pH del cobre	10
<i>Figura 10:</i> Esquema de efectos del exceso de Cu en planta	11
<i>Figura 11:</i> Diagrama Eh-pH del plomo	12
<i>Figura 12:</i> Esquema de efectos del Pb en planta	14
<i>Figura 13:</i> Diagrama Eh-pH del mercurio	15
<i>Figura 14:</i> Esquema de efectos del Hg en planta	17
<i>Figura 15:</i> Dibujo esquemático de diferentes técnicas de fitorremediación	23
<i>Figura 16:</i> Ejemplos de tipos de macrófitas	25
<i>Figura 17:</i> Lámina de <i>Typha domingensis</i>	27
<i>Figura 18:</i> Localización de los puntos de muestreo en el distrito minero de Almadén	30
<i>Figura 19:</i> Esquema de las diferentes fracciones de estudio de <i>Typha domingensis</i>	33
<i>Figura 20:</i> Analizador Avanzado de Mercurio (AMA-254) ubicado en la Unidad de Conservación y Recuperación de Suelos del Ciemat	34
<i>Figura 21:</i> Equipo Perkin Elmer Aanalyst 700 ubicado en la Unidad de Conservación y Recuperación de Suelos del Ciemat	34
<i>Figura 22:</i> Fotografía del liofilizador LyoQuest -55	36
<i>Figura 23:</i> Detalle de las bandejas de carga del liofilizador	36
<i>Figura 24:</i> Microondas Ethos Plus (Milestone, Inc.)	37
<i>Figura 25:</i> Vaso preparado para ser introducido en el microondas	37
<i>Figura 26:</i> Acoplamiento instrumental para la especiación de mercurio	39
<i>Figura 27:</i> Variación de pH en los sedimentos a lo largo del río Valdezogues	43
<i>Figura 28:</i> Variación de conductividad eléctrica en los sedimentos a lo largo del río Valdezogues	45
<i>Figura 29:</i> Variación del porcentaje de materia orgánica en los sedimentos a lo largo del río Valdezogues	45
<i>Figura 30:</i> Evolución de la concentración de Hg total en sedimentos a lo largo del río Valdezogues	47
<i>Figura 31:</i> Evolución de la concentración total de Pb a lo largo del río Valdezogues	48
<i>Figura 32:</i> Evolución de la concentración total de Zn a lo largo del río Valdezogues	48

Figura 33: Evolución de la concentración total de Cu a lo largo del río Valdezogues	49
Figura 34: Distribución porcentual media de Hg en sedimento	49
Figura 35: Distribución porcentual media de Pb en sedimento	50
Figura 36: Distribución porcentual media de Zn en sedimento	50
Figura 37: Distribución porcentual media de Cu en sedimento	51
Figura 38: Diagrama de cajas y bigotes de concentración de Hg en las diferentes fracciones de <i>T. domingensis</i> detallando valores inferiores a 25 mg kg ⁻¹	51
Figura 39: Valores medios de concentración de Hg obtenidos durante los tres años de estudio en las diferentes fracciones de <i>T. domingensis</i> en cada uno de los puntos de muestreo	52
Figura 40: Diagrama de cajas y bigotes de acumulación de Pb en las diferentes fracciones de <i>T. domingensis</i>	53
Figura 41: Valores medios de concentración de Pb obtenidos durante los tres años de estudio en las diferentes fracciones de <i>T. domingensis</i> en cada uno de los puntos de muestreo	53
Figura 42: Diagrama de cajas y bigotes de acumulación de Zn en las diferentes fracciones de <i>T. domingensis</i>	54
Figura 43: Valores medios de concentración de Zn obtenidos durante los tres años de estudio en las diferentes fracciones de <i>T. domingensis</i> en cada uno de los puntos de muestreo	55
Figura 44: Diagrama de cajas y bigotes de acumulación de Cu en las diferentes fracciones de <i>T. domingensis</i>	56
Figura 45: Valores medios de concentración de Cu obtenidos durante los tres años de estudio en las diferentes fracciones de <i>T. domingensis</i> en cada uno de los puntos de muestreo	56
Figura 46: Diagrama de dispersión volumen y peso seco de hoja	65
Figura 47: Diagrama de dispersión de pronósticos tipificados por residuos tipificados	66
Figura 48: Gráfico de probabilidad normal de los residuos	66
Figura 49: Diagrama de dispersión de pronósticos tipificados por residuos tipificados	68
Figura 50: Gráfico de la probabilidad normal de los residuos	68
Figura 51: Recuperación de metilmercurio (MeHg) y mercurio inorgánico (IHg) en hoja dopada de acuerdo con la temperatura de extracción	73
Figura 52: Recuperación de metilmercurio (MeHg) y mercurio inorgánico (IHg) en hoja dopada variando de acuerdo con el volumen de reactivo TMAH	73
Figura 53: Esquema general de extracción alcalina (TMAH) de metilmercurio y mercurio inorgánico en muestras de hoja de <i>T. domingensis</i>	74
Figura 54: Porcentaje de recuperación de metilmercurio y mercurio inorgánico mediante extracción ácida en muestras de hoja de <i>T. domingensis</i> dopadas	75
Figura 55: Esquema general de extracción ácida (HNO ₃ 6 N) de metilmercurio y mercurio inorgánico en muestras de <i>T. domingensis</i> dopadas	75
Figura 56: Concentración de metilmercurio en muestras de <i>T. domingensis</i> y en sedimento recogidas en el año 2013	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Producción mundial en toneladas de diversos metales	1
Tabla 2: Características del río Valdeazogues y Alcudia	6
Tabla 3: Dosis oral y concentraciones inhalación de referencia de algunos compuestos de mercurio	16
Tabla 4: Límites de detección para la especiación de mercurio en diversas técnicas híbridas	21
Tabla 5: Principales técnicas de tratamiento de suelos contaminados por metales pesados	22
Tabla 6: Ventajas e inconvenientes de la tecnología de fitorremediación	24
Tabla 7: Procesos promovidos en humedales por la presencia de macrófitas	26
Tabla 8: Resumen de muestras recogidas en las diferentes campañas de campo	31
Tabla 9: Coordenadas de los puntos de muestreo	31
Tabla 10: Procedimiento de extracción secuencial en seis pasos desarrollada por Sánchez et al. (2005)	32
Tabla 11: Esquema de métodos para especiación de Hg en muestras biológicas (Berzas Nevado et al., 2005) y sedimento (Berzas Nevado et al., 2008)	37
Tabla 12: Parámetros del acoplamiento GC-pyro-AFS	40
Tabla 13: Valores porcentuales de pH en los sedimentos recogidos a lo largo del distrito minero de Almadén y su clasificación de acuerdo con USDA (1993)	44
Tabla 14: Valores porcentuales de conductividad eléctrica en los sedimentos recogidos a lo largo del distrito minero de Almadén y su clasificación de acuerdo con Schoeneberger et al. (2012)	45
Tabla 15: Proporción de los porcentajes de materia orgánica en los sedimentos recogidos a lo largo del distrito minero de Almadén clasificados de acuerdo con EPA (1991)	46
Tabla 16: Diferencias en la concentración de Hg entre diferentes órganos analizados de <i>T. domingensis</i>	52
Tabla 17: Diferencias en la concentración de Pb entre diferentes órganos analizados de <i>T. domingensis</i>	54
Tabla 18: Diferencias en la concentración de Zn entre diferentes órganos analizados de <i>T. domingensis</i>	55
Tabla 19: Diferencias en la concentración de Cu entre diferentes órganos analizados de <i>T. domingensis</i>	57
Tabla 20: Intervalos de concentración de Hg observados en bibliografía con especies del género <i>Typha</i>	57
Tabla 21: Intervalos de concentración de Pb observados en bibliografía con especies del género <i>Typha</i>	58
Tabla 22: Intervalos de concentración de Zn observados en bibliografía con especies del género <i>Typha</i>	58
Tabla 23: Intervalos de concentración de Cu observados en bibliografía con especies del género <i>Typha</i>	59
Tabla 24: Patrones de acumulación de Hg, Pb, Zn y Cu en <i>T. domingensis</i>	59
Tabla 25: Patrones de acumulación de Hg, Pb, Zn y Cu en <i>T. domingensis</i> excluyendo el núcleo radicular	60
Tabla 26: Factores de translocación de Hg, Zn y Cu en cada punto de muestreo	61

Tabla 27: Rango de factores de bioacumulación de Hg, Pb, Zn y Cu en hoja y raíz en cada punto de muestreo	62
Tabla 28: Valores umbrales de hiperacumulación de Hg, Pb, Zn y Cu en plantas	63
Tabla 29: ANOVA del modelo de regresión simple	65
Tabla 30: Coeficientes de regresión	65
Tabla 31: Valores de varianza residual. Variable explicativa x	67
Tabla 32: Valores de varianza residual. Variable explicativa $\ln(x)$	67
Tabla 33: Valores de varianza residual. Variable explicativa $\sqrt{x}$	67
Tabla 34: ANOVA del modelo de regresión simple	67
Tabla 35: Coeficientes de regresión	68
Tabla 36: Cantidad teórica de metal extraído (mg m^{-2}) en VZ-7	69
Tabla 37: Criterios para la aplicación de técnicas de fitoextracción y fitoestabilización	70
Tabla 38: Resumen de valores de TF, BAF y umbrales de hiperacumulación en <i>T. domingensis</i>	70
Tabla 39: Correlaciones de concentración de Hg entre las diferentes fracciones y el sustrato	71
Tabla 40: Correlaciones de concentración de Pb entre las diferentes fracciones y el sustrato	71
Tabla 41: Correlaciones de concentración de Zn entre las diferentes fracciones y el sustrato	71
Tabla 42: Correlaciones de concentración de Cu entre las diferentes fracciones y el sustrato	71
Tabla 43: Recuperaciones de metilmercurio y mercurio inorgánico en muestras de hoja dopadas utilizando TMAH como agente extractante	73
Tabla 44: Comparativa de concentraciones de mercurio total certificado y los obtenidos (por suma de especies) mediante extracción ácida y alcalina	76
Tabla 45: Porcentajes de recuperación de metilmercurio y mercurio inorgánico en materiales de referencia (n=5)	77
Tabla 46: Límites de detección y cuantificación del sistema GC-pyro-AFS para cada tipo de extracción	77
Tabla 47: Recuperación de mercurio inorgánico aplicando preconcentración en muestras de NCS ZC73027	78
Tabla 48: Recuperación de especies de mercurio aplicando preconcentración en muestras dopadas de NCS ZC73027	78
Tabla 49: Estudios de especiación de mercurio en muestras vegetales	80
Tabla 50: Concentraciones de metilmercurio (ng g^{-1}), mercurio inorgánico y total ($\mu\text{g g}^{-1}$) y porcentaje de metilmercurio respecto al mercurio total, en diferentes muestras de sedimentos recogidos en el distrito minero de Almadén en el año 2013	83
Tabla 51: Concentración de metilmercurio y mercurio inorgánico (ng g^{-1}) y porcentaje de metilmercurio respecto al mercurio total, en diferentes fracciones de muestras de <i>Typha domingensis</i> recogidas en el distrito minero de Almadén en el año 2013	83
Tabla 52: Factores de traslocación de metilmercurio en <i>T. domingensis</i>	84
Tabla 53: Factor de bioacumulación de metilmercurio en muestras de <i>T. domingensis</i>	84

RESUMEN

Los principales objetivos de la presente tesis han sido por un lado, el estudio de la distribución y acumulación de mercurio, plomo, cobre y cinc en la planta acuática *Typha domingensis* Pers. creciendo de forma natural en la Comarca Minera de Almadén. Y por otro lado, el desarrollo de un método analítico que permita la extracción y cuantificación de metilmercurio en muestras de matriz vegetal.

De acuerdo con los resultados, la mayor acumulación de metales pesados en *T. domingensis* tiene lugar en los órganos subterráneos existiendo una baja translocación hacia la parte aérea. Dicha acumulación es altamente eficiente cuando se compara con los bajos niveles de concentración de metales disponibles en el sedimento, haciendo que *T. domingensis* sea una buena candidata para ser utilizada en técnicas de fitoestabilización.

En el caso de la optimización del método especiación de mercurio, se ha logrado desarrollar un procedimiento que permite realizar la extracción y cuantificación simultánea de metilmercurio y mercurio inorgánico en muestras vegetales de una forma rápida y fiable.

ABSTRACT

The main objectives of this PhD thesis were, on the one hand, the study of distribution and accumulation of mercury, lead, copper and zinc in the aquatic plant *Typha domingensis* Pers. growing in the Almadén mining district. And the other hand, the development of an analytic method to extract and quantify the methylmercury in samples with vegetal matrix.

According to the results, the highest accumulation of heavy metals in *T. domingensis* takes place in the underground organs and therefore, the translocation to the aerial part is very low. This accumulation is highly efficient when it is compared to the low available metal concentration in the sediment, making *T. domingensis* a good candidate to be used in phytostabilization techniques.

For the optimization of a mercury speciation method, it has developed a new procedure that allows the simultaneous extraction and quantification of methylmercury and inorganic mercury in plant samples in a quickly and reliable way.

Capítulo I: INTRODUCCIÓN

La finalidad de este primer apartado es introducir al lector en la problemática existente en la actualidad sobre la contaminación de suelos por metales pesados y cómo la comarca minera de Almadén se ha convertido en un enclave interesante para la realización de estudios acerca de dicha temática. A continuación, se expondrán algunas de las propiedades de cada uno de los metales estudiados en esta tesis, seguido de las posibles técnicas de descontaminación en suelos que existen en el presente, con especial énfasis en la fitorremediación. Por último, se mostrará al lector ciertos conocimientos sobre las técnicas de especiación de metales.

1.1. Los metales pesados y el distrito minero de Almadén

La explotación y uso de los metales pesados por parte del ser humano se ha estado realizando desde hace miles de años, y sus aplicaciones, las cuales han ido aumentando a lo largo de la historia, han ayudado a que podamos alcanzar el alto grado de desarrollo del que disfrutamos en la actualidad. Así, procesos como la fabricación de herramientas y armas, la producción de medicinas o la construcción de edificios y medios de transporte, son ejemplos del destacado papel que juegan los metales pesados en nuestro día a día. Sin embargo, este hecho a su vez ha provocado que exista un aumento en la dependencia hacia estos recursos y por consiguiente, en la explotación de los mismos, la cual se ha ido acentuando hasta alcanzar en las últimas décadas niveles vertiginosos. Ejemplos de ello se puede observar en la evolución de la producción minera mundial del cobre (Tabla 1), donde en el año 2012 se llegó a extraer una cantidad 2,5 veces superior a la registrada en el año 1970, o más sorprendente aún es la correspondiente al hierro, donde, para el mismo periodo de tiempo, la producción aumentó aproximadamente unas 3.900 veces. La aparición de nuevos usos, el aumento de la población mundial con especial atención al auge que están experimentando países de mercados emergentes como son China e India, o los avances en las mejoras de los métodos de extracción y producción, son algunos de los factores que han promovido dicho incremento en la explotación de metales.

Tabla 1: Producción mundial en toneladas de diversos metales

	Producción mundial (toneladas)				
	1970	1980	1990	2000	2012
Mercurio	$9,8 \times 10^3$	$6,6 \times 10^3$	$4,7 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$
Plomo	$3,4 \times 10^6$	$3,5 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$3,1 \times 10^6$	$5,3 \times 10^6$
Cinc	$5,4 \times 10^6$	$6,2 \times 10^6$	$7,1 \times 10^6$	$8,8 \times 10^6$	$13,5 \times 10^6$
Cobre	$6,4 \times 10^6$	$7,7 \times 10^6$	$9,3 \times 10^6$	$13,2 \times 10^6$	$16,8 \times 10^6$
Hierro	$7,7 \times 10^5$	$9,0 \times 10^8$	$9,8 \times 10^8$	$1,1 \times 10^9$	$3,0 \times 10^9$

Datos procedentes de BGS (1978, 1986, 1995, 2006, 2014)

Sin embargo, el uso de los metales pesados por parte del ser humano ha favorecido la contaminación de muchos emplazamientos, provocando de este modo que los diferentes individuos que conforman el entorno, ya sea por ejemplo la flora y fauna (incluyendo aquí al propio ser humano), se vean expuestos a estos contaminantes y por consiguiente a un potencial riesgo para los mismos. Un ejemplo que demuestra la elevada presencia de los metales pesados como elemento contaminante, lo podemos encontrar en los Estados Unidos donde, de los más de 1.200 emplazamientos contaminados y catalogados dentro de la Lista de Prioridades Nacionales, aproximadamente el 63% de dichos enclaves se hallan afectados por algún metal pesado (Mulligan et al., 2001). Mientras que en el caso de la Unión Europea, los metales pesados como principal contaminante suponían de media en el año 2011 el 31% de los emplazamientos analizados, existiendo países como Bélgica y la República Yugoslava de Macedonia donde este porcentaje llega a aumentar hasta el 50 y 60% respectivamente (EEA, 2014). Asimismo, otro aspecto importante a destacar, es el hecho de que la contaminación puede llegar a ser transfronteriza, provocando de este modo que exista una posibilidad elevada de encontrar entornos afectados cuya fuente de contaminación se encuentre alejada de los mismos.

Por tanto, ante esta gran problemática, la comunidad científica lleva décadas empleadas en el estudio acerca del impacto que los metales pesados provocan en el medio y a su vez, el de las posibles vías de mitigación y/o descontaminación de los mismos. De este modo, las comarcas mineras se han convertido en uno de los emplazamientos ideales para llevar a cabo este tipo de trabajos, ya que éstas actúan como auténticos “laboratorios naturales” donde se pueden desarrollar dichos trabajos.

En el caso de España, son diversos los yacimientos mineros que se encuentran repartidos a lo largo de todo el territorio nacional, pudiendo destacar de entre ellos: La Comarca Minera de Almadén. Situada al suroeste de la provincia de Ciudad Real (Figura 1), dentro de la Comunidad Autónoma de Castilla-La Mancha (España), esta comarca se encuentra conformada por los municipios de Agudo, Alamillo, Almadén, Almadenejos, Chillón, Guadalmez, Saceruela y Valdemanco de Esteras.

*Figura 1: Localización del distrito minero de Almadén
(Fuente: www.d-maps.com y www.google.com)*

Con una extensión aproximadamente de 300 km², dicha área, en la que se ha desarrollado el presente estudio, se distingue por ser el mayor yacimiento de mercurio del mundo y su historia extractiva se remonta a más de 2.000 años de antigüedad, cesando su explotación en mayo de 2002 mientras que su actividad metalúrgica continuó en funcionamiento hasta el año 2004 (Gray et al., 2002; Hernández Sobrino, 2007). La producción realizada durante todo ese periodo ha permitido que más de un tercio (285.000 toneladas) de todo el mercurio producido en el mundo haya salido de este distrito (Hernández et al., 1999).

De las minas existentes en la zona, la mina de Almadén ha sido la más grande y explotada de todas ellas, seguida por las minas de El Entredicho, Las Cuevas y Nueva Concepción, aunque también es posible encontrar otras pequeñas explotaciones a lo largo de todo la comarca. Con respecto a los complejos metalúrgicos, cabe destacar dos de ellos, uno situado en la mina de Almadén y otro en la localidad de Almadenejos (Higueras et al., 2006).

Sumada a la minería del mercurio, en el distrito minero de Almadén también se ha llevado a cabo la explotación de otros metales como Pb-Zn y Cu pudiéndose encontrar un número significativo de minas disgregadas a lo largo de la comarca, aunque dicha explotación nunca ha llegado a ser tan significativa como la del mercurio. Así, las minas más representativas de Pb-Zn son Quinto de Hierro, Jacinta, San José Andrea y Nuestra Señora de la Encarnación, mientras que las de cobre son Peñoncillo, Mineta y La Solana (IGME, 1987; IGN, 2007 y García-Ordiales, 2014b).

1.1.1. Geología

El distrito minero de Almadén se encuentra situado en la parte meridional de la denominada Zona Centro-Ibérica del Macizo Hespérico (García Sansegundo et al., 1987). El sustrato geológico del distrito está formado por una sucesión paleozoica (Ordovícico a Devónico Superior) fuertemente tectonizada, en la cual, pizarras, grawacas, cuarcitas, areniscas y volcanitas, en sustratos de disposición frecuentemente subvertical, constituyen las rocas dominantes (Figuras 2 y 3). Las rocas más antiguas corresponden a pizarras y grawacas del Precámbrico (García Sansegundo et al., 1987). En toda la serie son comunes las intrusiones de rocas subvolcánicas básicas (diabasas) (Higueras et al., 2000).

Figuras 2 y 3: (Arriba) Mapa geológico del área circundante al sinclinal de Almadén. (Derecha) Mapa Geológico del sinclinal de Almadén (Palero-Fernández et al. 2015).

En este contexto geológico, las mineralizaciones de mercurio se limitan a la estructura geológica conocida como Sinclinal de Almadén, y están principalmente asociadas a la formación de “Cuarcita del Criadero”, del Silúrico Inferior (García Sansegudo et al., 1987). Mineralizaciones secundarias de Hg están vinculadas a diques en cuarcitas, así como a *stockworks* encajados en materiales volcánicos o volcano-sedimentarios del Silúrico y Devónico (Hall et al., 1996). La mineralización está constituida casi exclusivamente por cinabrio (Álvarez et al., 1988).

Mientras, las mineralizaciones de otros metales como Pb, Zn y Cu son de una edad posterior a la del mercurio las cuales pertenecen a series de filones hidrotermales ligados a las fases más tardías del emplazamiento de los granitos hercínicos (García et al., 1987). Así, el principal mineral de Pb en la Comarca de Almadén es la galena (PbS), mientras que el Zn y el Cu son la blenda (ZnS) y la calcopirita (CuFeS₂) respectivamente (Carcavilla y Palacio, 2010).

Los depósitos cuaternarios coluviales, se presentan extensamente al pie de los principales relieves cuarcíticos, en tanto que los depósitos aluviales, de naturaleza mixta dada la variedad litológica existente, se definen claramente en los principales cauces como Valdeazogues o Alcudia (García Sansegudo et al., 1987).

De acuerdo con la disposición de los estratos, los principales relieves tienen una disposición predominante E-W (Figura 4). Las altitudes mayores (750-850 m), como la Sierra de Cordoneros y la Cerrata, corresponden a las alineaciones cuarcíticas del Ordovícico Inferior (1). Sierras de menor altitud, en torno a los 600 m (2), están formadas por cuarcitas del Silúrico (correspondientes a las principales mineralizaciones de Hg) o Devónico. Por otra parte, los principales valles generalmente corresponden a pizarras y grawacas precámbricas, como en el río Valdeazogues (3), en altitudes entre los 380 y 500 m.

Figura 4: Mapa esquemático en el que se representan los principales relieves de la comarca minera de Almadén. Mapa base obtenido del IGN.

Así, la red de drenaje principal está fuertemente condicionada por la orientación E-W de los estratos. Ha de señalarse asimismo que la baja permeabilidad de los sustratos favorece una densa red de drenaje, cuya dinámica hidrológica está por tanto determinada por el régimen de precipitaciones.

1.1.2. Suelos

En el ámbito de la comarca minera de Almadén, las características de los suelos vienen condicionadas, principalmente, por la diversidad litológica, el relieve, y las condiciones climáticas. El conjunto de materiales descrito anteriormente, aparece en general fuertemente plegado y fracturado, en un contexto de relieves

suaves, localmente fuertes en las sierras. Por otra parte, la zona corresponde a un clima típicamente mediterráneo, de temperaturas contrastadas y precipitaciones moderadas con una intensa sequía estival.

En un contexto general, se trata de suelos ácidos y de textura variada, siendo generalmente escasos en materia orgánica; no obstante, en la zona de estudio, han sido observadas localmente cantidades significativas de materia orgánica humificada asociada, por un lado, a zonas de cobertura vegetal densa en relieves cuarcíticos, y por otra a zonas con intensa actividad ganadera.

Específicamente, los suelos asociados a los principales fondos aluviales poseen una naturaleza mixta, como resultado de la variedad litológica de las cuencas, y una granulometría generalmente arenosa, con presencia variable de materia orgánica y elementos gruesos.

Los suelos del ámbito de estudio, de acuerdo con el sistema *Soil Taxonomy*, se incluyen en el régimen de humedad “xérico”, característico de ambientes mediterráneos con un prolongado periodo de sequía estival (USDA, 2014). Los criterios que definen ambos regímenes son determinantes de la clasificación de los suelos según este sistema. Así, los suelos del entorno estudiado se incluyen en los órdenes *Alfisoles*, *Inceptisoles* y *Entisoles*, correspondiendo respectivamente, y de acuerdo con el citado régimen de humedad, a los subórdenes *Xeralfs*, *Xerepts* y *Orthents* (grupo *Xerorthents*) (Nieves y Gómez-Miguel, 1992).

Concretamente, en zonas de deposición activa, como es el caso de los valles de los principales cauces, se presentan *Entisoles* del suborden *Fluvents* y grupo de los *Xerofluvents*.

1.1.3. Climatología

El clima de la comarca de Almadén es típicamente mediterráneo con inviernos húmedos y fríos y veranos calurosos y secos. Los datos recogidos a lo largo de 30 años en las estaciones meteorológicas del pueblo de Fontanosas y de la mina de Almadén (Figuras 5 y 6), muestran valores de temperaturas medias anuales de 15,8 y 15,1 °C y unas precipitaciones medias anuales de 613 y 638 mm respectivamente. La evapotranspiración potencial registrada en la zona ronda los 870 mm, durante los meses de verano se produce una disminución de las reservas de agua provocando la sequedad del suelo, que continúa hasta el siguiente otoño con el comienzo del periodo de lluvias (SIGA, 2014). Por último, los datos registrados en la estación meteorológica de Ciudad Real muestran que los vientos dominantes siguen una dirección Este-Oeste a lo largo de la zona (AEMET, 2014).

Figuras 5 y 6: Temperaturas y precipitaciones media de la estación meteorológica de mina de Almadén (arriba) y del pueblo de Fontanosas (abajo)

1.1.4. Redes hidrográficas

Los principales cursos fluviales en la comarca de Almadén son el río Valdezogues y el Alcudia, los cuales se encuentran incluidos dentro de la Confederación Hidrográfica del Guadiana. En el caso del río Valdezogues sus aguas fluyen en sentido Este-Oeste a lo largo de todo el distrito minero, discurriendo cerca de diversas explotaciones e incluso llegando a atravesar una de ellas: la mina a cielo abierto de El Entredicho. Sus afluentes más importantes son el Gargantiel, Tamujar y Azogado; de este último cabe destacar el hecho de que parte de sus aguas drenan la mina de Almadén y su complejo metalúrgico.

Por otro lado, el río Alcudia se encuentra enclavado en el valle del mismo nombre y cuyo curso lo atraviesa en sentido Este-Oeste hasta confluir con el río Valdezogues. Una de las características que lo diferencia del río Valdezogues es que su cauce no se encuentra influenciado de forma directa por minería de mercurio aunque sí por la de otros metales como Pb y Zn. También a lo largo de los márgenes de su cauce se desarrollan actividades tanto agraria, ganadera o combinación de ambas.

El principal aporte de agua en las cuencas procede de las lluvias ya que la contribución por parte de los acuíferos es reducida. La velocidad de ambos ríos es muy baja debido a la escasa pendiente de sus cauces (1%), existiendo incluso zonas remansadas o también llamadas tablas, las cuales durante el periodo de sequía estival hacen que se formen pequeños remansos aislados a lo largo de los cursos. Efecto contrario sucede durante el periodo de lluvias, donde se pueden llegar a originar inundaciones y avenidas (con caudales punta de hasta $500 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$) que provocan el arrastre y transporte de materiales que son posteriormente depositados lejos del lugar de origen y que ayudan de este modo a aumentar la dispersión de los contaminantes (García-Ordiales, 2014a).

Tabla 2: Características del río Valdezogues y Alcudia

Río	Longitud (km)	Área (km ²)	Aportación natural (hm ³)
Valdezogues	68,79	777,88	75,17
Alcudia	46,41	437,08	33,98

Datos procedentes de CHG (2014)

1.1.5. Fauna

En la comarca minera de Almadén podemos encontrar una gran riqueza faunística. Dentro de la región se ubican dos ZEPA (Zona de Especial Protección de Aves), una de ellas es la ZEPA de las Sierras de Almadén,

Chillón y Guadalmez y la otra la de la Sierra de Canalizos, las cuales destacan por ser las principales zonas de concentración premigratoria de cigüeña negra (*Ciconia nigra*) en Castilla-La Mancha. Otras aves como el águila real (*Aquila chrysaetos*), alimoche (*Neophron percnopterus*) y el buitre negro (*Aegypius monachus*) pueden también ser avistados a lo largo del distrito. La gineta (*Genetta genetta*), el gato montés (*Felis silvestris*) y el tejón (*Meles meles*) son algunos de los mamíferos que habitan dichos parajes.

Con respecto a la fauna presente en los ríos destacan como especies nativas los barbos (*Barbus* sp.), calandinos (*Squalius alburnoides*) y pardillas (*Iberochondrostoma lemmingii*) mientras que también es notoria la presencia de especies introducidas como carpas (*Cyprinus carpio*), pez sol (*Lepomis gibbosus*) y perca americana (*Micropterus salmoides*).

En el marco socioeconómico, uno de los mayores reclamos que existen actualmente en la región es la actividad cinegética tanto de caza mayor (ej. Venado - *Cervus elaphus*) como de caza menor (ej. Perdiz - *Alectoris rufa*). Sumado a ello, también podemos encontrar actividades ganaderas, siendo la explotación ovina la principal de la zona, mientras que la bovina, porcina y caprina son desarrolladas en menor medida.

1.1.6. Flora

De acuerdo con la clasificación establecida por Rivas-Martínez (1987), la comarca de Almadén se encuentra emplazada dentro de la provincia corológica Luso-Extremadurensis. La mayoría de la vegetación presente en el distrito minero se caracteriza por su adaptación al clima mediterráneo, siendo las dehesas, con la destacada presencia de las encinas (*Quercus ilex* subsp. *ballota*), una de las estampas típicas de la región. Acompañando a esta formación, podemos encontrar áreas repobladas con pino resinero (*Pinus pinaster*).

Por el contrario, en aquellas zonas donde no existe pastoreo o las características del medio no son favorables, es común la presencia de arbustos como el enebro (*Juniperus oxycedrus*), lentisco (*Pistacia lentiscus* L.) y diversas especies de jaras (*Cistus*) (Molina et al., 2006).

Ya en las zonas de vega y cursos fluviales, encontramos una amplia variedad de plantas higrófilas conformada por especies leñosas como los eucaliptos (*Eucalyptus* sp.), chopos (*Populus* sp.), sauces (*Salix* sp.), tarais (*Tamarix canariensis* Willd.), tamujos (*Flueggea tinctoria*), adelfas (*Nerium oleander*) y fresnos (*Fraxinus angustifolia*) y especies macrófitas como el ranúnculo (*Ranunculus saniculifolius*), la espadaña (*Typha domingensis*) y carrizo (*Phragmites australis*) (Millán et al., 2006).

1.2. Metales Pesados

En los apartados anteriores se ha estado realizando referencia al término “metal pesado” sin especificar exactamente qué significa o engloba realmente el mismo. Para ello, si atendemos a la definición clásica de “metal pesado”, encontramos que suele utilizarse para hacer referencia a aquellos metales de la tabla periódica cuya densidad es mayor de 5 g cm⁻³, aunque dependiendo de la fuente consultada, podemos encontrar otros valores límites que oscilan entre 3,5 y 7 g cm⁻³ (Duffus, 2002). Sin embargo, la utilización de la densidad como criterio para determinar qué es un metal pesado es bastante imprecisa, sobre todo si se tienen en cuenta su propiedades fisicoquímicas y funciones biológicas (Shaw et al., 2004). Así, muchos autores han propuesto el uso del término “metal tóxico”, aunque dicha denominación también es imprecisa por dos motivos: i) Un metal pesado no es tóxico por sí mismo (aunque no tenga función biológica), sino sólo es tóxico cuando la concentración de metal biodisponible supera un determinado umbral y ii) Algunos metales son necesarios en pequeñas cantidades (ej. Co, Cu, Fe, Mn, Mo, Ni y Zn) para el correcto desarrollo de los seres vivos pero que al igual que cualquier sustancia, un exceso en su concentración puede ser también perjudicial para el individuo (Appenroth, 2010). Por tanto, ante esta dificultad de poder definir qué es un metal pesado, una posible solución es la descrita por Tiller (1989) en la que engloba los metales pesados como aquellos metales clasificados como “contaminantes globales”, lo que permitiría de este modo la inclusión de otros elementos como es el caso del aluminio que, aunque posee una baja densidad, es un elemento a tener en cuenta por su toxicidad en medios ácidos (Ramos Miras, 2002).

Para la presente tesis, se ha querido abarcar el estudio de cuatro metales pesados: mercurio, plomo, cinc y cobre. Los cuales, como se ha podido leer anteriormente, han sido extraídos en la comarca minera de Almadén a lo largo de los años. Además, dichos metales han poseído o poseen grandes tasas de explotación a nivel mundial y por consiguiente, son los causantes de muchos episodios de contaminación. De esta forma, en los siguientes subapartados se va a introducir al lector en ciertos conocimientos sobre dichos metales, comenzando en primer

lugar por su historia, continuando con sus propiedades fisicoquímicas y finalizando con los efectos que produce su acumulación (y en el caso de los oligoelementos también su deficiencia) tanto en el ser humano como en las plantas.

1.2.1. Cinc

1.2.1.1. Antecedentes históricos del cinc

Los primeros restos humanos que atestiguan un uso intencionado del cinc datan de entre 1.400 y 1.000 a.C. en la zona correspondiente a la actual Palestina donde fueron encontrados restos de latón con un contenido del 23% de este metal (Greenwood y Earnshaw, 1997). Posteriormente, durante el Imperio Romano se continuó con su utilización aunque su verdadera naturaleza como metal no empezó a ser conocida hasta el siglo XIV en la India. En China, durante la Dinastía Ming (1368 – 1644) el cinc fue utilizado para la fabricación de monedas. Pero, no fue hasta 1743, cuando se creó la primera planta de fundición a escala industrial en la ciudad inglesa de Bristol y cuya producción se extendió posteriormente a Bélgica y Silesia (región ubicada en la actual Polonia).

En la actualidad, alrededor del 40% del cinc que es consumido en el mundo es destinado para la creación de capas protectoras contra la corrosión de metales como son el hierro o el acero (ATSDR, 2005). También, otra de sus aplicaciones más extendidas es el uso de óxidos de cinc en la industria del caucho para la activación del proceso de vulcanización y como retardante del envejecimiento del caucho. En medicina, es utilizado como agente de mejora de la solubilidad de compuestos siendo un ejemplo de ello la insulina. Por último, el sulfato de cinc es aplicado en agricultura como fertilizante y en la ganadería para la alimentación animal como elemento traza y agente de control de enfermedades.

1.2.1.2. Propiedades fisicoquímicas del cinc

El cinc o zinc es un metal de color blanco azulado, relativamente débil con una densidad de $7,13 \text{ g cm}^{-3}$, número atómico 30 y peso atómico 65,39 u.m.a. Dentro de la Tabla Periódica se ubica en el grupo 12 (II B) (Adriano, 2001). Su nombre se cree que procede del alemán “Zink” cuyo significado es “diente” o “pico” debido al aspecto que posee el mineral de la calamina ($\text{Zn}_4\text{Si}_2\text{O}_7(\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) y siendo por tanto a partir de este nombre de donde se obtuvo su símbolo: Zn (Greenwood y Earnshaw, 1997).

Los principales estados de oxidación son: cinc metálico (Zn (0) o Zn^0) e ión cincato (Zn (II) o Zn^{2+}). Debido a su alta reactividad, la forma en la que se encuentra en la naturaleza es formando compuestos como ión cincato. En el caso de las sales inorgánicas, si éstas están formadas por la unión del cinc con cloratos, cloruros, sulfatos o nitratos, su solubilidad en agua será elevada, encontrándose el caso opuesto, cuando en dichos compuestos existen óxidos, carbonatos, fosfatos o sulfuros (ATSDR, 2005).

1.2.1.3. Déficit y toxicidad del cinc en humanos

El cinc es un oligoelemento esencial para los seres vivos siendo normalmente después del hierro el segundo metal de transición más abundante en los organismos. Es el único metal presente en las seis clases de enzimas (Broadley et al., 2007) llegando a ser cofactor de más de 300 de ellas, siendo además un elemento importante en el metabolismo de proteínas y ácidos nucleicos y en la estabilidad de la membrana plasmática (WHO, 2001). Por lo tanto, y al igual que con el resto de nutrientes, no sólo un exceso de este metal en el cuerpo humano provocará efectos adversos, sino que su deficiencia también afectará al correcto desarrollo del mismo.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, la dosis diaria recomendada para adultos oscila entre 0,13 y 0,21 $\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (WHO, 2001). Las posibles consecuencias derivadas de una dieta deficiente en dicho elemento puede provocar efectos como dermatitis, retardo en el crecimiento, absorción de la vitamina A, hipogonadismo, alteración del sistema inmunológico o mala cicatrización de heridas (ATSDR, 2005).

En cambio, la posibilidad de toxicidad por cinc es bastante limitada, y la bibliografía que existe en la actualidad suele hacer referencia a intoxicaciones agudas derivadas a la exposición accidental a altas concentraciones de este metal o por la administración de grandes dosis con fines terapéuticos y por lo tanto, la información que se posee sobre exposiciones crónicas es escasa (EPA, 2005).

Figura 7: Diagrama Eh-pH del cinc (Brookins, 1988)

Uno de los cuadros clínicos más conocidos es la denominada fiebre de humos metálicos (“*metallic fume fever*”) provocada por la inhalación aguda de óxidos de cinc y que se caracteriza por dolor de pecho, escalofríos, náuseas, fiebre, debilidad y sudoración entre otros. Estos síntomas aparecen a las pocas horas de la intoxicación y son reversibles pasados entre 1 y 4 días una vez cesada la exposición. Menos frecuentes son las situaciones en las que el compuesto inhalado es el cloruro de cinc, aunque, llegado el caso, sus efectos serían más dañinos al ser una sustancia corrosiva.

Por otro lado, en el caso de que una intoxicación crónica llegara a desarrollarse, uno de los síntomas más importantes es la disminución de la capacidad de absorción del cobre a través de los alimentos, lo que provoca los síntomas característicos de un déficit de este metal como es la anemia (Para conocer más acerca de los efectos por déficit de cobre ver apartado 1.2.2.3.). La EPA estipula para el cinc una dosis de referencia diaria de $0,3 \text{ mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (IRIS, 2014).

En último lugar, en lo referido a su carácter carcinogénico, el cinc y sus compuestos están clasificados como tipo D, es decir, no clasificables como carcinogénico en humanos de acuerdo con la EPA (IRIS, 2014).

1.2.1.4. Déficit y toxicidad del cinc en plantas

Como se ha mencionado anteriormente, el cinc es un oligoelemento necesario para el correcto desarrollo de los seres vivos. En las plantas, funciona como componente de un gran número de enzimas, catalizador de procesos de oxidación y transformación de carbohidratos, y también como estabilizador de los ribosomas citoplasmáticos y de las membranas plasmáticas (Adriano, 2001).

La concentración de cinc que una planta necesita para un crecimiento óptimo varía en función de la especie pero, síntomas de deficiencia suelen aparecer a partir de valores inferiores a 20 mg kg^{-1} en peso seco. Así, el rango de concentración considerado normal en vegetales varía entre 25 y 150 mg kg^{-1} en peso seco (Jones, 1972). Algunos de los ejemplos de los efectos derivados de la carencia de este microelemento en las plantas son: La reducción del tamaño de la hoja, clorosis intervenal, acortamiento en la longitud de los internodos, reducción del tamaño de los frutos y retraso en la floración.

Respecto a la toxicidad por Zn, al igual que en los seres humanos, ésta se encuentra menos extendida que la deficiencia. En muchos casos los síntomas se caracterizan por ser similares a cuando existen bajos niveles de hierro debido a que el cinc impide la reducción del hierro y su transporte al interior de la planta. La absorción de otros metales como fósforo, magnesio y manganeso también pueden verse afectados en la presencia de altas concentraciones de cinc (Chaney, 1993). A continuación se muestran algunos de sus efectos:

- **Fotosíntesis** → Altos niveles de Zn en planta provocan la alteración de la actividad de la enzima anhidrasa carbónica incidiendo de esta manera sobre el cierre de los estomas y por consiguiente, en la fijación de CO_2 . También puede reemplazar el Mg^{2+} presente en la clorofila e interferir en el transporte del Fe a los cloroplastos (Tsonev et al., 2012).
- **Crecimiento** → Se produce una inhibición en la elongación de las raíces y la disminución del desarrollo de raíces secundarias (Rout y Das, 2003).
- **Absorción de nutrientes** → A través de la alteración de la membrana plasmática se interfiere en la absorción de elementos como P, Mg o Mn (Chaney, 1993).
- **Estrés oxidativo** → El cinc provoca un estrés oxidativo que implica un aumento de la peroxidación de lípidos y la permeabilidad de la membrana (Madhava Rao y Sresty, 2000).

Figura 8: Esquema de efectos del exceso de Zn en planta. Los símbolos ↑ y ↓ representan aumento y disminución de la actividad respectivamente.

De acuerdo con Massa et al. (2010) el rango de concentración de toxicidad de cinc en plantas oscila entre 100 y 400 mg kg⁻¹ en peso seco en hoja. Es importante mencionar que los umbrales de toxicidad, ya sean del cinc u otro metal, poseen un carácter orientativo y por lo tanto, no pueden ser implantados de forma generalista a todas las plantas. Esto es debido por un lado, a que no todas las especies poseen la misma respuesta ante la acumulación de metales (pudiéndose incluso encontrar diferentes comportamientos a nivel de intraespecies) y por otro lado, que las condiciones ambientales en las que se desarrollan (pH, CE, presencia de otros metales, prácticas agronómicas...) influyen en gran medida los niveles a partir de los cuales surgen efectos tóxicos (Patra y Sharma, 2000; Tsonev et al., 2012).

1.2.2. Cobre

1.2.2.1. Antecedentes históricos del cobre

El cobre ha sido uno de los primeros metales utilizados por el hombre. Restos al sur de Turquía e Iraq demuestran que dicho metal ya era conocido desde hace más de 9.000 años aunque su fundición no empezó a ser notoria hasta el IV milenio a. C. En el año 3.000 a. C. el uso del cobre sufrió una mejora con la creación del bronce el cual se obtenía a partir de la fundición de cobre con estaño, permitiendo de esta manera que el material resultante poseyera mejores propiedades que cuando estaba formado sólo por cobre (ej: mayor dureza y resistencia frente a la corrosión), comenzando de este modo el periodo conocido como la Edad del Bronce.

Con el inicio de la Edad del Hierro (1.000 a. C. aproximadamente) el empleo del cobre y sus derivados disminuyó aunque su utilización continuó y se diversificó con la aplicación del latón. Llegada la Edad Media, su uso se derivó a la construcción de estatuas, catedrales y campanas mientras que en el Siglo XVI se empezó a utilizar para la fabricación de cañones.

Sin embargo, no fue hasta el descubrimiento de la electricidad y de las propiedades de dicho metal como buen conductor de la misma cuando su explotación ha experimentado un crecimiento exponencial ya que en la actualidad es el principal constituyente de cables y aparatos eléctricos (ATSDR, 2004; Copper Alliance, 2014).

1.2.2.2. Propiedades fisicoquímicas del cobre

El cobre es un metal rojizo brillante, maleable y dúctil. Su símbolo químico Cu proviene del latín "Cuprum" y a su vez del griego "Kýpros" el cual hace referencia a la isla de Chipre debido a las famosas minas que posee de este metal (Copper Alliance, 2014).

Se encuentra situado en el grupo 11 (I B) de la Tabla Periódica, su número atómico es 29 y su peso atómico 63,55 u.m.a. Entre sus propiedades destaca su resistencia a la corrosión, capacidad de aleación, alta conductividad térmica y, como se ha mencionado anteriormente, una alta conductividad eléctrica la cual sólo es superado por la plata (Callister, 1996).

Sus estados de oxidación más comunes son: cobre elemental (Cu (0) o Cu⁰), ión cuproso (Cu (I) o Cu⁺) e ión cúprico (Cu(II) o Cu²⁺). En este caso, y al igual que la plata y el oro, el cobre puede ser encontrado de forma elemental en la naturaleza (metal noble), aunque, es en forma de ión cúprico (Cu²⁺) como normalmente suele encontrarse en el medio. Dicho ión puede formar fuertes enlaces con óxidos de manganeso y de hierro mientras que en el caso de la materia orgánica la unión se realiza con grupos amino (-NH₂) y tiol (-SH) y en menor medida con grupos hidroxilo (-OH) (ATSDR, 2004). Añadido a estos tres estados de oxidación podemos encontrar otros dos, Cu(III) y Cu(IV), los cuales son más inusuales. El primero de ellos es un ión inestable que en los últimos tiempos está adquiriendo cierto interés a nivel biológico por su participación como intermediario en reacciones tanto enzimáticas como no enzimáticas. En cambio, el estado Cu⁴⁺ sólo se ha obtenido a través de procesos de fluoración (Popova y Aksenova, 2003; Sharpe, 1993).

Figura 9: Diagrama Eh-pH del cobre (Brookins, 1988)

1.2.2.3. Déficit del cobre y toxicidad en humanos

El cobre es, al igual que el cinc, uno de los micronutrientes esenciales para los seres humanos el cual actúa como componente de enzimas que intervienen en importantes procesos tanto energéticos como estructurales. Ejemplos de ello son las siguientes enzimas:

- **Ferroxidasa I y II** → Cataliza la oxidación del Fe²⁺ a Fe³⁺.
- **Lisil oxidasa** → Síntesis de colágeno.

- **Tirosinasa** → Cataliza la conversión de la tirosina en melanina.
- **Monoamina oxidasa** → Cataliza la oxidación de la epinefrina y serotonina.
- **Citocromo C oxidasa** → Interviene en la cadena respiratoria.

Por tanto, un déficit de este oligoelemento puede alterar una gran variedad de funciones en el cuerpo humano. Uno de los efectos más comunes es la anemia hipocrómica que consiste en la disminución de la velocidad de incorporación del hierro a la hemoglobina proceso en el cual interviene la enzima ferroxidasa (Miale, 1985). Otros desordenes como la hipomielinización (disminución en la producción de mielina), osteoporosis, leucopenia (bajo número de leucocitos) y desordenes cardiovasculares son también causados por la misma razón (Davis y Mertz, 1987).

El rendimiento de absorción del cobre en humanos ronda entre el 30 y el 50% pero, como se ha mencionado en el apartado 1.2.1.3, uno de los efectos derivados de la intoxicación por Zn es el déficit en Cu debido a la competencia que ejerce el cinc en la absorción de este metal. Otros elementos como Fe y Ca, fibras, ácidos orgánicos, vitamina C y aminoácidos pueden interferir también en el uso del Cu (ATSDR, 2004). Si bien, la ingesta diaria de Cu recomendada para niños entre 4 y 8 años es de 440 μg día⁻¹ mientras que para adultos es de 900 μg día⁻¹ (Otten et al., 2006).

En el caso de que a diferencia de un déficit, exista una exposición a altos niveles de Cu, el cuerpo humano puede experimentar efectos tóxicos que incluyen desde inmunotoxicidad y anemia hasta daños al riñón e hígado. Muchos de los efectos son derivados del daño oxidativo a membranas y macromoléculas debido a la unión del cobre con los grupos -SH de diversas enzimas como la glutatión reductasa o la glucosa-6-fosfatasa interfiriendo de este modo sobre la protección de las células contra los radicales libres (ATSDR, 2004). La dosis de referencia oral estipulada por la Health Effects Assessment Summary Tables (HEAST, 2014) es de 4×10^{-2} mg kg⁻¹ día⁻¹.

En lo referido a su poder cancerígeno, de acuerdo con la Agencia de Protección del Medio Ambiente de los Estados Unidos, el cobre está catalogado como clase D (no clasificable como cancerígeno en humanos) (IRIS, 2014).

1.2.2.4. Déficit de cobre y toxicidad en plantas

Uno de los fenómenos que se desarrolla cuando una planta posee bajos niveles de Cu es la disminución de la formación de plastoquinona lo que genera la reducción del transporte de electrones durante la fotosíntesis debido a que el Cu es un componente de dicha molécula (Shikanai et al., 2003). Otros efectos que pueden mostrarse son la desintegración de la membrana tilacoidal de los cloroplastos y una disminución del contenido de clorofila y carotenoides (Yruela, 2005).

En cambio, y al igual que en el resto de metales, una acumulación excesiva de estos también puede ocasionar síntomas adversos (Figura 10):

- **Fotosíntesis** → Cuando existen altos niveles de cobre, éste puede provocar la descomposición de carotenoides y clorofilas, alterar la estructura de los cloroplastos y la composición de la membrana tilacoidal. Además, se produce un aumento de la sensibilidad a la fotoinhibición y la clorosis en las hojas puede llegarse a confundir con los casos de deficiencia en Fe.
- **Estrés oxidativo** → Promueve la peroxidación lipídica con la generación de radicales libres y el consecuente daño al ADN (Adriano, 2001).
- **Otros** → En plantas leñosas algunos síntomas de intoxicación son la senescencia de hojas, necrosis de las ramas, y raíces bulbosas y atrofiadas (Arnold et al., 1994).

El rango de concentraciones de Cu en hoja considerado como tóxico oscila entre 20 y 100 mg kg⁻¹ (Massa et al., 2010).

Figura 10: Esquema de efectos del Cu en planta. Los símbolos ↑ y ↓ representan aumento y disminución de la actividad respectivamente

1.2.3. Plomo

1.2.3.1. Antecedentes históricos del plomo

Los primeros registros sobre minas de plomo (Pb) datan sobre el año 6.500 a.C. en lo que actualmente es la región de Turquía, aunque no fue hasta la época del Imperio Romano donde su explotación se hizo significativa ya que, durante dicho periodo, el plomo era utilizado para la fabricación de tuberías debido a su bajo coste, y cuyo uso ha perdurado hasta la actualidad, aunque debido a su toxicidad está siendo sustituido por otros materiales como el cobre. Además del sanitario, la fabricación de vasijas para contener vino era otra de las aplicaciones que los romanos otorgaban al plomo (Thrumond, 2016).

Durante la Edad Media, el uso del plomo disminuyó considerablemente pero, con la llegada de la Revolución Industrial éste aumentó de forma drástica ya que, a principios del Siglo XX, los compuestos orgánicos tetraetilo y tetrametilo de plomo se empezaron a añadir a la gasolina para que de este modo aumentase su octanaje.

Dicha utilización tuvo una gran acogida hasta que, a la vista de los efectos perjudiciales que el plomo ejercía sobre la salud humana se empezó a prohibir su adición, empezando de este modo en los Estados Unidos año 1981 y continuando en la Unión Europea en el año 2.000 a través de la Directiva 98/70/CE. Sin embargo, en la actualidad se sigue utilizando en algunos países en desarrollo (ATSDR, 2007). Otro de los usos que ha perdurado hasta finales del siglo pasado ha sido el de aditivo para las pinturas, pero su sabor dulce, el cual lo hacía tentador para los niños, promovió su prohibición (Directiva 76/769/CEE).

Así, algunos de los ámbitos en los que actualmente es utilizado el plomo son como componente de cables, munición, pigmentos y productos químicos, aunque el mayor uso a nivel mundial (más de tres cuartas partes) es para la fabricación de baterías de plomo-ácido de vehículos de motor (OMS, 2013).

1.2.3.2. Propiedades fisicoquímicas del plomo

El plomo es un metal de color plateado con tono azulado que se presenta en estado sólido a temperatura y presión ambiental. Su símbolo químico es Pb derivado del latín “*Plumbum*”.

Situado en el grupo 14 (IV A) de la Tabla Periódica, su número atómico es 82 y su peso atómico 207,2 u.m.a. Sus múltiples propiedades como pueden ser su facilidad para fundir, alta densidad ($11,34 \text{ g cm}^{-3}$ a 20°C), bajo punto de fusión ($327,4^\circ\text{C}$), baja resistencia y estabilidad química en aire, agua y suelo son las causantes de su amplia utilización a lo largo de la historia (ATSDR, 2007; RAIS, 2014).

Posee tres estados de oxidación: plomo elemental ($\text{Pb}(0)$ o Pb^0), ión plumboso ($\text{Pb}(II)$ o Pb^{2+}) e ión plúmbico ($\text{Pb}(IV)$ o Pb^{4+}). No es común encontrar plomo de forma elemental en la naturaleza sino formando asociaciones con otros elementos. En la mayoría de los compuestos inorgánicos, el plomo suele encontrarse en el estado de oxidación 2+ mientras que en los compuestos orgánicos, el estado de oxidación tetravalente (4+) es el dominante (Adriano, 2001).

Respecto a la solubilidad del plomo en agua, ésta varía en función del compuesto, así, el plomo puro es insoluble al igual que sus óxidos (17 mg L^{-1} a 20°C) y carbonatos ($1,1 \text{ mg L}^{-1}$ a 25°C) que son casi insolubles. De hecho, cuando el plomo metálico es expuesto al aire o al agua, se suelen formar películas de sulfatos, óxidos, y carbonatos de plomo que actúan como barrera protectora que retarda o detiene la corrosión del metal subyacente (ATSDR, 2007). En el caso opuesto encontramos las sales de cloruro y bromuro de plomo las cuales poseen una alta solubilidad (9.900 y 8.441 mg L^{-1} respectivamente).

1.2.3.3. Toxicidad del plomo en humanos

En los Estados Unidos, la Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades perteneciente al Departamento de Salud y Servicios Humanos realiza de forma periódica la Lista de Sustancias Prioritarias (Substance Priority List – SPL) donde están catalogadas las 275 sustancias que son encontradas más frecuentemente en los emplazamientos incluidos en la Lista Nacional de Prioridades (National Priority List – NPL). El orden en el que aparecen estas sustancias en dicha lista está basado en su frecuencia, toxicidad y potencial exposición a humanos (ATSDR, 2014).

Figura 11: Diagrama Eh-pH del plomo (Brookins, 1988)

Dentro de la SPL, el plomo ocupa el puesto número 2 sólo superado por el arsénico. Este hecho, aunque sea solo en Estados Unidos, permite a modo de ejemplo, dar una idea de la alta repercusión que posee el plomo como contaminante y el elevado riesgo que supone para la salud humana debido tanto a su alta toxicidad como a su presencia en el entorno.

Así, en lo referente a su capacidad de absorción en humanos, ésta dependerá tanto de la forma química en la que se encuentra como de la vía de exposición:

- **Vía inhalatoria** → El plomo inorgánico es capaz de acceder a través de las partículas de aerosoles que posteriormente se depositan en el tracto respiratorio. En cambio, la entrada del plomo orgánico se realizará a través de vapores.
- **Vía oral** → La absorción de compuestos inorgánicos de plomo depende de diversos factores como edad (mayor en niños que en adultos, llegando a absorber hasta el 50%), ayuno (mayor en el caso de no haber ingerido alimentos) y nutrición (la deficiencia en calcio y hierro aumenta la absorción de plomo).
- **Vía dérmica** → La absorción de plomo inorgánico a través de la piel es casi inexistente aumentando significativamente en los compuestos orgánicos debido a su carácter lipófilo.

Una vez dentro del cuerpo, la mayor acumulación del plomo se lleva a cabo en los huesos (alrededor del 95%) aunque el principal órgano diana es el sistema nervioso siendo los temblores, el insomnio, la falta de atención, el déficit del lenguaje, los problemas en la coordinación, los cambios de comportamiento y la fatiga algunos de los efectos descritos por acumulación de Pb (ATSDR, 2007). De hecho, el dios romano Vulcano, patrón de los herreros, mostraba determinados síntomas de intoxicación avanzada por plomo como son la cojera, palidez y la expresión arrugada. Otros efectos derivados de este metal son aumento de la tensión arterial y lesiones renales (OMS, 2013). La forma en la que se conoce comúnmente la intoxicación por plomo es con el nombre de “*Saturnismo*” cuyo término proviene del nombre Saturno el cual era el modo en el que los alquimistas denominaban al plomo (Warren, 2000). Otro de los efectos comunes derivado de la intoxicación por plomo es la anemia, la cual está provocada como consecuencia de la inhibición de enzimas que intervienen en la producción de hemoglobina.

Actualmente, no se encuentran dosis de referencia para el plomo por parte de los principales organismos internacionales. En el caso de la EPA, dicha agencia considera que es inapropiado el desarrollo de dosis de referencia para plomo inorgánico y sus compuestos, debido a que algunos de los efectos derivados de la exposición a este metal ocurren a niveles tan bajos que puede descartarse la existencia de un determinado umbral (EPA, 2014).

Respecto a su efecto carcinogénico, el plomo está catalogado por la EPA como B2, es decir, probable carcinogénico en humanos. Esto es debido a que en los casos estudiados en humanos no se encontraron suficientes evidencias que corroborasen la existencia de una asociación casual entre la exposición al plomo y la mortalidad por cáncer pero sin embargo, ensayos llevados a cabo con animales han aportado suficientes datos que hacen pensar que el plomo es un elemento cancerígeno (IRIS, 2014). Mientras, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha determinado que los compuestos orgánicos de plomo no son clasificables como carcinogénicos (grupo 3) debido a las insuficientes evidencias obtenidas a través de los estudios realizados en humanos y animales (IARC, 2006).

1.2.3.4. Toxicidad del plomo en plantas

La absorción y acumulación del plomo por parte de las plantas puede provocar diversos efectos tóxicos en el que pueden verse afectados distintos procesos siendo algunos de los descritos a continuación:

- **Fotosíntesis** → El plomo provoca una disminución de la fotosíntesis debida entre otros a la inhibición en la síntesis de clorofila (inducida por la reducción en la absorción de elementos esenciales como Mg o Fe), la inhibición del fotosistema II e inducción al cierre estomático (Parys et al., 1998).
- **Respiración** → A bajas concentraciones parece ser que existe una estimulación de la respiración en las plantas. El aumento de ATP se realiza como resultado de la alta demanda de energía que realiza la planta para combatir los efectos del plomo, aunque a mayores concentraciones, se produce una inhibición de la actividad de la ATP sintetasa (Shao et al., 2011).

- **Absorción de nutrientes** → Muchos de los efectos del plomo parece ser provocados de forma indirecta por la ineficiente absorción de otros metales esenciales para el correcto desarrollo de la planta (como es en el caso de la fotosíntesis). Así, el plomo bloquea la entrada de cationes (K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{3+}) y aniones (NO_3^-) en el sistema radicular. Dicho bloqueo se realiza tanto de forma física (bloqueando los canales de absorción de iones) o modificando la estructura de la membrana y sus enzimas (Sharma y Dubey, 2005).

- **Estrés oxidativo** → El plomo acelera la producción de radicales libres a través de la inducción de la peroxidación lipídica, la disminución de los ácidos grasos poliinsaturados y el incremento de ácidos grasos insaturados en la membrana plasmática de muchas plantas (Singh et al., 2010).

- **El efecto antimitótico** → Es uno de los más conocidos viéndose implicados dos procesos. Por un lado, la unión del plomo a la membrana plasmática y a la pared celular de las plantas, les otorga cierta rigidez y reduce la capacidad de división de la célula. Y por otro lado, se produce la alteración de los microtúbulos que impide la migración de los cromatidios hermanos hacia los polos de la célula provocando de este modo el fenómeno denominado como c-mitosis (Pourrut et al., 2011).

Muchos de los efectos mencionados vienen derivados, por la afinidad del plomo por los ligando de azufre y nitrógeno presentes en la estructura de numerosas proteínas (Sharma y Dubey, 2005; van Assche y Clijsters, 1990). De acuerdo con Massa et al. (2010) el umbral de toxicidad para plantas es bastante amplio, oscilando entre 30 y 300 $mg\ kg^{-1}$ de peso seco en hoja.

Figura 12: Esquema de efectos del Pb en planta. Los símbolos ↑ y ↓ representan aumento y disminución de la actividad respectivamente

1.2.4. Mercurio

1.2.4.1. Antecedentes históricos del mercurio

El conocimiento sobre la utilización del mercurio (Hg) a lo largo de la historia de la humanidad ha quedado reflejado en los miles de registros que han perdurado hasta la actualidad. Ya en las antiguas civilizaciones egipcias (S. XVI a. C.), griegas y chinas (S. IV a. C) el mineral de cinabrio (HgS) era utilizado como tinte para la ropa, pigmento para ceremonias religiosas, maquillaje e incluso como medicamento (Matilla Tascón, 2005; Neustadt y Pieczenik, 2007). Estos usos continuaron y aumentaron a lo largo de los siglos, llegando por ejemplo a convertirse en la Edad Media en uno de los elementos más importantes en el arte de la alquimia. Pero no fue hasta el siglo XVI cuando el uso del mercurio adquirió una gran relevancia debido a su aplicación en la extracción de oro y plata mediante el proceso de amalgamación conocido como Beneficio del patio, el cual en la actualidad sigue siendo utilizado en la minería artesanal del oro.

Además de estos usos, son muchas otros los que han llegado hasta nuestros días como son su empleo en termómetros, instrumental de medida, amalgamas de plata para empastes dentales, medicamentos, catalizador en procesos cloro-alcalinos, espectrofotómetros UV, interruptores, lámparas fluorescentes, fuegos artificiales e incluso, en el caso de los compuesto orgánicos de mercurio, como plaguicida y fungicida (Carrico, 1985; Rieber y Harris, 1994).

Sin embargo, debido a su alta toxicidad y su riesgo asociado tanto para los ecosistemas como para el ser humano, se han ido desarrollando normativas que regulan su uso y comercialización como es en el caso de la Unión Europea con el Reglamento (CE) N° 1102/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de octubre de 2008 relativo a la prohibición de la exportación de mercurio metálico y ciertos compuestos y mezclas de mercurio y al almacenamiento seguro de mercurio metálico donde se determina que a partir del 15 de marzo de 2011 queda prohibida la exportación por parte de la Comunidad de mercurio metálico, mineral de cinabrio, cloruro de mercurio (I), óxido de mercurio (II) y mezclas de mercurio metálico con otras sustancias. Sólo quedan exentos de prohibición los compuestos con fines terapéuticos o analíticos o de investigación y desarrollo. Mientras a nivel mundial, en octubre de 2013 se llevó a cabo la redacción del Convenio de Minamata, en el que los países firmantes se comprometen a adoptar las medidas pertinentes en prohibir la fabricación, importación y exportación de los productos con mercurio añadido y también en la eliminación de ciertos procesos de fabricación en los que el mercurio es uno de los componentes del proceso productivo. En los anexos de dicho convenio viene estipulados aquellos productos y procesos pendientes de eliminación y la fecha límite para llevarlo a cabo. El plazo para que pudiera ser firmado finalizó el 9 de octubre de 2014. Llegada esa fecha, han sido un total de 127, los países que han firmado ese acuerdo. Sin embargo, estas firmas no implican que el Convenio de Minamata entre en vigor directamente, sino que esto se producirá pasados 90 días a partir de la fecha en la que haya sido depositado el quincuagésimo instrumento de ratificación, aceptación, aprobación o adhesión. Así, a fecha de 20 de noviembre de 2016, por ahora han sido sólo 35 Estados los que han ratificado dicho documento.

1.2.4.2. Propiedades fisicoquímicas del mercurio

El mercurio es un metal pesado de color plateado brillante que se presenta en estado líquido a temperatura y presión ambiental. Fueron estas características las que hicieron que los romanos denominaran en latín a dicho metal como “Hydrargyrum” cuyo significado es plata líquida, y fue, a partir de este mismo nombre, de donde se adquirió su símbolo químico: Hg.

Este metal se encuentra situado en el grupo 12 (II B) de la Tabla Periódica, su número atómico es 80 y su peso atómico 200,59 u.m.a. Posee una alta densidad ($13,60 \text{ g cm}^{-3}$ a 25°C), bajo punto de fusión ($-38,87^\circ\text{C}$) y un elevado punto de ebullición ($356,58^\circ\text{C}$).

El mercurio posee tres estados oxidativos: mercurio elemental ($\text{Hg}(0)$ o Hg^0), ión mercurioso ($\text{Hg}(\text{I})$ o Hg_2^{2+}) e ión mercúrico ($\text{Hg}(\text{II})$ o Hg^{2+}), siendo sus propiedades muy diferentes dependiendo de cada uno de estos estados (Adriano, 2001). El mercurio elemental es volátil a temperatura ambiente y encontrarlo en la naturaleza es bastante inusual (salvo en la atmósfera donde se halla como vapor), siendo las sales el modo más habitual. Estas sales se constituyen a través de la unión de los iones mercurioso (Hg_2^{2+}) y mercúrico (Hg^{2+}) con otros elementos pudiendo conformar compuestos tanto inorgánicos como orgánicos. Algunas de las sales inorgánicas más comunes son el cloruro mercúrico (HgCl_2) cuya constante de producto de solubilidad es muy elevada ($2,6 \times 10^{-15} \text{ mg L}^{-1}$ a 25°C) en contraposición con el sulfuro de mercurio (HgS) con una constante de $1,6 \times 10^{-54} \text{ mg L}^{-1}$ (a 25°C) y cuya alta estabilidad es debida a la gran afinidad que posee el ión mercúrico por el azufre (Sherwood Lollar, 2005). Mientras, las principales sales orgánicas que suelen encontrarse en la naturaleza son el monometilmercurio y dimetilmercurio los cuales a diferencia de las sales inorgánicas son altamente liposolubles.

Figura 13: Diagrama Eh-pH del mercurio (Brookins, 1988)

1.2.4.3. Toxicidad del mercurio en humanos

Si anteriormente se mencionaba que el plomo se encontraba en el puesto número 2 de la Lista de Sustancias Prioritarias, el mercurio ocupa la posición número 3 y por tanto, es un elemento a tener en cuenta por su gran impacto y toxicidad. Sin embargo, a diferencia de los EEUU o la Unión Europea, donde actualmente existe una legislación que limita el uso del mercurio y la cual ha conllevado a una disminución de su liberación al medio, existen muchos otros países, sobre todo aquellos que se encuentran en vías de desarrollo, donde el control en la utilización de dicho metal es mucho menor y que están provocando la aparición de nuevos focos de contaminación.

Volviendo a lo referente a la capacidad de toxicidad del mercurio, ésta dependerá tanto de la forma química en la que se encuentra como de la ruta de exposición:

- **Vía inhalatoria** → La inhalación de vapores es la principal ruta de exposición del mercurio elemental donde el porcentaje de absorción ronda entre el 70 y el 80%. En cambio, para los compuestos inorgánicos y orgánicos no se han llevado a cabo estudios al respecto aunque en el caso del mercurio orgánico existen evidencias indirectas de que puede ser fácilmente absorbido a través de los pulmones (ATSDR, 1999).
- **Vía oral** → La asimilación del mercurio elemental es muy baja por vía gastrointestinal. En cambio, la absorción de sales inorgánicas de mercurio puede variar entre el 2 y el 38% dependiendo de la forma de éstas (y de las condiciones en las que se ha llevado a cabo el test). Así, aquellos compuestos más solubles en agua, como el cloruro de mercurio (HgCl_2), estarán más bioaccesibles que aquellas formas más estables como puede ser el sulfuro de mercurio (HgS) (Sin et al., 1983). Sin embargo, los compuestos orgánicos son los que más fácilmente pueden ser absorbidos por vía oral debido a que son, como se ha nombrado anteriormente, los más liposolubles, llegando a alcanzar absorciones del 95%. Dicho porcentaje variará en función del alimento ingerido, siendo de esta forma, la bioaccesibilidad en productos de origen animal sea mayor que la de los de origen vegetal debido a que estos últimos poseen fibras que no pueden ser digeridas por el ser humano. De hecho, la principal vía de entrada de mercurio en el hombre es a través del metilmercurio presente en el pescado (Bravo et al., 2014; WHO, 1990).
- **Vía dérmica** → Los estudios llevados a cabo con vapor de mercurio muestran que la cantidad absorbida a través de la piel es muy baja al igual que la del mercurio metálico líquido (Hursh et al., 1989). En el caso de los compuestos organomercuriales no se dispone de datos cuantitativos aunque dado su carácter lipófilo este tipo de absorción puede llegar a ser muy elevada (ATSDR, 1992; Risher et al., 2002).

Una vez acumulado en el cuerpo humano, los principales efectos que se desarrollarán serán a nivel del sistema nervioso ya que el mercurio actúa como neurotoxina. Dicha toxicidad está provocada por la alta afinidad que posee el mercurio con los grupos sulfhidrilo o tiol ($-\text{SH}$) aunque también es capaz de unirse a grupos amida, fosforilo y carboxilo. Dicha unión genera alteraciones en numerosas proteínas con funciones enzimáticas, de transporte y estructurales.

La intoxicación por mercurio es denominada como “*Hidrargirismo*” siendo algunos de los efectos derivados de la misma: temblor involuntario, déficit en memoria, cambios emocionales, alteraciones mucosas y dificultad en la coordinación psicomotora entre otros. Además, las especies orgánicas poseen una alta facilidad de atravesar la placenta y pueden llegar a causar daño cerebral al feto (Gilbert, 2012). En la tabla 3 se muestran dosis de referencia y concentración de referencia para algunos compuestos del mercurio.

Tabla 3: Dosis oral y concentraciones inhalación de referencia de algunos compuestos de mercurio

Compuesto	Dosis oral de referencia ($\text{mg kg}^{-1} \text{ día}^{-1}$)	Fuente	Concentración de referencia ($\text{m}^3 \text{ día}^{-1}$)	Fuente
Mercurio elemental	$1,60 \times 10^{-4}$	CALEPA	$3,00 \times 10^{-4}$	IRIS
Cloruro de mercurio	$3,00 \times 10^{-4}$	IRIS	$3,00 \times 10^{-4}$	IRIS
Metilmercurio	$1,00 \times 10^{-4}$	IRIS	-	-

Consultado en Risk Assessment Information System (RAIS) el 13 junio 2014

Por último, con respecto a su potencial carcinogénico, la EPA (Agencia de los Estados Unidos para la Protección del Medio Ambiente) cataloga el mercurio elemental como tipo D, es decir, no clasificable como carcinogénico, mientras que el cloruro de mercurio y el metilmercurio están designados como de clase C, lo que corresponde a posible carcinogénico en humanos (ausencia de datos en humanos y limitadas evidencias en animales) (IRIS, 2014).

1.2.4.4. Toxicidad del mercurio en plantas

Al igual que en el caso del reino animal, el mercurio no posee ninguna función biológica en las plantas (Beauford et al., 1977) siendo diversos los efectos que provoca su acumulación en estos organismos que difieren según el órgano o tejido afectado. En la figura 14 se muestra un resumen de algunos de los efectos que produce dicho metal sobre las plantas y los cuales son descritos a continuación:

- **Desarrollo** → El mercurio provoca la inhibición del crecimiento e hipertrofia de las raíces (Setia et al., 1994).
- **Fotosíntesis** → Puede provocar la disminución en la fluorescencia de la clorofila del fotosistema II y la inhibición de la cadena de transporte de electrones (Bernier et al., 1993).
- **Absorción de nutrientes** → La absorción de nutrientes también puede verse afectada debido a que puede provocar cambios en la permeabilidad de la membrana plasmática y el reemplazo de iones esenciales, principalmente cationes (Kabata-Pendias, 2011).
- **Régimen Hídrico** → El mercurio provoca la inhibición de las acuoporinas provocando por consiguiente la disminución en el volumen de las células guarda y alterando de este modo los movimientos estomáticos (Cárdenas-Hernández et al., 2009)
- **Estrés oxidativo** → La estimulación de la producción de radicales libre es otro de los efectos derivados de la exposición al mercurio pudiendo incluso dañar el ADN (De et al., 1985).

Algunas de las causas de dicha toxicidad es, como se ha comentado anteriormente, debido a la alta afinidad que poseen los cationes de mercurio por los grupos sulfhidrilo (-SH) presentes en la mayoría de las proteínas y que, una vez unido a ellas, modifican su estructura y de este modo provocan que pierdan su funcionalidad (Clarkson, 1972).

Con respecto al umbral de toxicidad de mercurio en plantas, éste oscila entre 1 y 3 mg kg⁻¹ de peso seco en hoja (Massa et al., 2010).

Figura 14: Esquema de efectos del Hg en planta. Los símbolos ↑ y ↓ representan aumento y disminución de la actividad respectivamente

1.3. Especiación de mercurio

Debido a los efectos nocivos que genera la contaminación, han ido surgiendo normativas ambientales (sobre todo en países con economías avanzadas) cuyos objetivos son evitar y limitar el impacto que las actividades humanas pueden generar sobre el medio ambiente. Las pautas que siguen dichos reglamentos para alcanzar tales fines suelen ser muy similares, pudiendo ser resumidas en tres puntos:

1. Prevenir la generación de nuevos casos de afección al medio, regulando para ello las actividades potencialmente contaminantes.
2. Establecimiento de directrices que permitan evaluar el grado de contaminación de un emplazamiento cuando existan evidencias que indiquen que puede haberse producido un impacto sobre el mismo.

3. En caso de que tras dicha evaluación se confirmase que existe contaminación, otorgar a la administración pertinente las herramientas necesarias, para obligar al causante del daño a la recuperación del medio afectado.

En relación a lo expuesto en el punto número 2, la medición de la concentración total de metales presentes en un emplazamiento, es una práctica habitual para conocer si un área se encuentra contaminada. Sin embargo, la información que pueden aportar estas técnicas sobre el grado de afección y su riesgo asociado, no es del todo completa ya que existen otros factores como la especiación del metal que determinan en gran medida la movilidad, biodisponibilidad, acumulación y toxicidad (Leermakers et al., 2005; Peakall y Burger, 2003; Suedel et al., 2006). Por lo tanto, para comprender aún más el comportamiento de los metales pesados y sus formas químicas, es necesario el desarrollo de métodos analíticos que permitan identificar y cuantificar cada una de sus especies, siendo además indispensable el cumplimiento por parte de estas técnicas de los siguientes requisitos: i) Tener el menor número de etapas posibles para evitar de este modo episodios de contaminación, pérdidas y modificaciones de los equilibrios entre las especies presentes (Jiménez Moreno, 2008) y ii) Estar adaptadas a la matriz de estudio en la que estamos interesados (ej. agua, sedimento, planta, músculo, etc.) (Maier et al., 1995).

Como solución a este problema, han ido surgiendo a lo largo de las últimas décadas, métodos analíticos que permiten la identificación y cuantificación de las diferentes especies que un metal puede presentar en el entorno. Para el desarrollo de dichas técnicas se tiene que tener en cuenta una serie de aspectos como son el tipo de muestra (matriz) a analizar, el analito a determinar y nivel de concentración en el que se encuentra, precisión y exactitud deseada y la conservación de la muestra.

En la presente tesis se ha querido centrar la atención únicamente en la especiación de mercurio en plantas ya que es el contaminante predominante en la zona de estudio. Además, es en los sistemas acuáticos donde se dan las condiciones favorables para que se lleve a cabo su transformación a metilmercurio (King et al., 2002; Marvin-DiPasquale et al., 2014), sumándose a ello el escaso número de estudios que existen acerca de la acumulación de dicho compuesto en plantas.

De este modo, atendiendo a los métodos analíticos presentes en la actualidad para la especiación de mercurio en muestras sólidas, éstos suelen constar de las siguientes etapas:

- **Extracción** de las especies de mercurio desde la muestra medioambiental.
- **Preconcentración** de las especies en el extracto obtenido para, de este modo, poder alcanzar límites de detección óptimos de acuerdo a la técnica elegida.
- **Derivatización** (depende de la técnica de separación seleccionada) para la transformación de las especies de mercurio en compuestos volátiles.
- **Separación** de las especies sin alterar los niveles de concentración iniciales.
- **Detección** individual de cada especie separada previamente.

En las siguientes secciones se va a llevar a cabo un breve recorrido por cada una de estas etapas, mostrando algunas de las técnicas que existen en la actualidad para el desarrollo de las mismas.

1.3.1. Extracción de especies de mercurio

El primer paso en un análisis de especiación de mercurio, es la extracción de las diferentes especies a partir de la muestra medioambiental. Es una etapa crítica, ya que las especies deben extraerse sin producir transformaciones en su forma química, habiendo que tener en cuenta el tipo de matriz con el que se va a trabajar ya que la composición de la misma es un factor determinante en la eficiencia de la extracción (Maier et al., 1995). Dicha muestra requiere estar molida para que de esta forma se favorezca el contacto entre muestra y disolvente (Cámara et al., 2002). En la actualidad, las técnicas de extracción empleadas pueden clasificarse en los siguientes grupos:

1.3.1.1. Extracción ácida

Es el método más empleado en la especiación de mercurio, pudiéndose diferenciar a su vez dos tipos de técnicas:

- **Método Westöo – Extracción ácida con disolvente:** Este método consiste en el empleo de una solución de ácido clorhídrico y un disolvente orgánico para de esta manera, obtener el metilmercurio en forma de cloruro de metilmercurio (CH_3HgCl) (Westöo, 1966).
- **Digestión ácida:** En este caso es posible realizar la extracción simultánea de Hg^{2+} y CH_3Hg^+ sin necesidad de utilizar disolventes. Los ácidos que normalmente se suelen emplear son ácido nítrico o una combinación de ácido nítrico con clorhídrico. Además, este proceso suele realizarse con la ayuda de microondas o ultrasonidos para de esta manera mejorar la técnica en términos de tiempo, eficiencia y consumo de solución (Ramalhosa y Río-Segade, 2008).

1.3.1.2. Extracción alcalina

Posee la capacidad de romper los enlaces del mercurio con proteínas y lípidos. Los extractantes más utilizados son, por un lado, KOH en metanol y, por otro lado, el hidróxido de tetrametilamonio (TMAH) (Nollet, 2006). Al igual que en la digestión ácida, el empleo de microondas o ultrasonidos, mejora la eficacia y eficiencia de la extracción.

1.3.1.3. Destilación o volatilización ácida

En este caso la muestra sólida es tratada con H_2SO_4 y NaCl o KCl con el objetivo de producir especies volátiles de mercurio para ser posteriormente destiladas utilizando una corriente de nitrógeno. El empleo de esta técnica requiere de un especial cuidado ya que durante la destilación puede llegarse a desarrollar la formación artificial de metilmercurio a partir de mercurio inorgánico (Bloom et al., 1997).

1.3.1.4. Extracción con fluidos supercríticos

Las ventajas de este método están vinculadas a las propiedades de los fluidos supercríticos (densidad, viscosidad y difusividad) la cual puede ser controlada a través de variaciones en la presión y temperatura permitiendo de este modo acelerar el proceso de extracción y reducir a su vez su coste, toxicidad, cantidad de solvente necesario y residuo generado (Carro et al., 1998).

Sin embargo, pese a sus grandes ventajas, es una tecnología todavía en proceso de mejora ya que el porcentaje de recuperación de metilmercurio por ahora es inferior al de otras técnicas como es la extracción en microondas (Lorenzo et al., 1999).

1.3.2. Preconcentración de las especies de mercurio

Cuando las concentraciones de las especies de mercurio son muy bajas, es necesario llevar a cabo una etapa previa de preconcentración para que de esta manera, se alcancen los niveles idóneos para que puedan ser detectados por el instrumental analítico seleccionado.

Los procesos de preconcentración más empleados son:

1.3.2.1. Extracción líquido-líquido (LLE)

Este proceso consiste en la transferencia de un soluto presente en un líquido a otro líquido por el cual dicho analito posee mayor afinidad, siendo ambos líquidos inmiscibles entre sí. Los reactivos que se suelen utilizar son la cisteína y tiosulfato sódico. Este proceso se basa en la capacidad de formación de complejos del mercurio con N y S (Aguilar Martínez, 2010).

1.3.2.2. Atrapamiento criogénico

En este método se lleva a cabo la extracción y preconcentración de los derivados volátiles de los analitos realizando una etapa previa de generación de hidruros o derivatización y posteriormente una purga con una corriente gaseosa hacia una columna con un relleno análogo al de una columna cromatográfica sumergida en nitrógeno líquido. Después, cada especie es desorbida y separada en función de sus puntos de ebullición por calentamiento de la columna. Otra opción es que se lleve a cabo una desorción completa y que la separación se realice en una columna cromatográfica situada a continuación de la trampa (Dietz et al., 2000; Jiménez Moreno, 2008).

1.3.2.3. Extracción en fase sólida

El principio de esta técnica se basa en la afinidad que posee el analito de interés por un sorbente sólido cuando se obliga a pasar la muestra a través de dicha fase. De este modo, se consigue que el analito quede retenido en el sorbente sólido, permitiendo a la vez una eliminación parcial de aquellos interferentes que puedan estar presentes en la muestra. Algunos ejemplos de sorbentes sólidos son fibras de algodón de

sulfhidrido o resinas de ditiocarbamato. Una vez realizada la retención, el analito es eluido utilizando unos pocos mililitros de un solvente orgánico.

1.3.2.4. Microextracción en fase sólida

Esta técnica unifica la etapa de muestreo, aislamiento y preconcentración de una forma sencilla y permite su acoplamiento a una gran variedad de detectores. Su función se basa en el establecimiento de un equilibrio de absorción de los analitos de interés sobre el recubrimiento de una fibra de sílice fundida como puede ser el divinilbenceno (DVB), carboxeno (CAR) o el polidimetilsiloxano (PDMS), siendo esta última la más extendida.

Una ventaja de este método con respecto al de la extracción en fase sólida es que se minimizan los tiempos de manipulación de la muestra y con ello se disminuyen los riesgos de pérdida o transformación (Peñalver Hernando, 2002). Y además, puede unirse tanto a cromatografía líquida como de gases (Pawliszyn, 1999).

1.3.3. Derivatización

Para poder realizar el análisis de especiación de mercurio a través de la separación por cromatografía gaseosa es necesario que los compuestos de mercurio a analizar, los cuales suelen estar en forma de especies iónicas, sean transformados a especies no polares. Estos compuestos (no polares) son más volátiles y además no se descomponen dentro de la columna cromatográfica debido a que poseen una mayor estabilidad térmica (Nollet, 2006).

Uno de los métodos de derivatización clásicos es la reacción de Grignard, la cual permite elegir entre diferentes grupos alquilo para obtener las correspondientes especies alquiladas. Sin embargo este método es largo y tedioso con numerosos pasos, siendo además necesaria la extracción de los compuestos organometálicos en disolventes orgánicos debido a que los reactivos de Grignard son sensibles al agua. (Donard et al., 2001).

Como alternativa a la derivatización de Grignard han surgido otros procedimientos, uno de ellos es la generación de hidruros a través del uso de borohidruro sódico (NaBH_4). Este compuesto convierte el metilmercurio en hidruro de metilmercurio (CH_3HgH) y reduce el mercurio inorgánico a mercurio elemental quedando dichas reacciones representadas de la siguiente manera:

Dicha técnica permite alcanzar una mayor exactitud del método a la par que se consigue una reducción de tiempos y costes. En cambio, también posee algunos inconvenientes como son la producción excesiva de hidrógeno y la inestabilidad de las especies resultantes.

Otra de las técnicas de derivatización, es la etilación utilizando como reactivo el tetraetilborato de sodio ($\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ o NaBEt_4), la cual es la más empleada en la actualidad (Ramalhosa y Río-Segade, 2009). Este compuesto reacciona con el mercurio inorgánico y el metilmercurio formando dietilmercurio ($\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)_2$ o Et_2Hg) y etilmetilmercurio ($\text{CH}_3\text{Hg}(\text{C}_2\text{H}_5)$ o MeEtHg) respectivamente, siguiendo las siguientes reacciones:

Una de las principales ventajas que posee la etilación con NaBEt_4 frente a la derivatización por Grignard es que no necesita que el proceso de extracción se realice con disolvente orgánico. En cambio, el mayor inconveniente que presenta este método es que no permite distinguir entre el mercurio inorgánico (Hg^{2+}) y etilmercurio ($(\text{C}_2\text{H}_5)\text{Hg}^+$) (Carrasco et al., 2009).

1.3.4. Técnicas cromatográficas para separación de especies de mercurio

Previo a la identificación y cuantificación de cada uno de los compuestos del mercurio, es necesario llevar a cabo la separación de dichos compuestos. La separación se puede llevar a cabo mediante técnicas cromatográficas y no cromatográficas. De entre todas las técnicas de especiación, aquellas que están conformadas mediante el acoplamiento de una separación cromatográfica con un detector atómico sensible, son las que mejores resultados ofrecen y por ello son las más extendidas actualmente. De este modo, y teniendo en cuenta esta premisa, en los siguientes apartados sólo se van a desarrollar los fundamentos de las técnicas de separación cromatográfica de los cuales podemos encontrar dos tipos: cromatografía de gases (GC) y cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

1.3.4.1. Cromatografía de gases (GC)

De entre las dos técnicas cromatográficas, ésta es la más utilizada en la especiación de mercurio. Esto es debido a que posee un fácil manejo y puede ser acoplada de forma sencilla a un amplio número de detectores. Además, también otorga una alta resolución debido a que la transferencia de los analitos al detector se lleva a cabo sin nebulización, permitiendo mejorar así los límites de detección (Ramalhosa y Río-Segade, 2009).

1.3.4.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

A diferencia de la cromatografía de gases, esta técnica no requiere un proceso previo de derivatización lo que se traduce en la reducción, por un lado, del tiempo empleado en el método y, por otro lado, de la potencial pérdida de analitos. Además, las separaciones entre las diferentes especies son mejores con este tipo de cromatografía. Sin embargo, el mayor inconveniente del HPLC es su baja sensibilidad, mucho menor en comparación con GC (Leermakers et al., 2005).

1.3.5. Sistemas de detección de especies de mercurio

Después de la separación de las especies de mercurio mediante la cromatografía, se llega al último paso que consiste en la detección y cuantificación de cada uno de los compuestos. Para ello, existe en la actualidad una gran variedad de detectores, siendo algunos de ellos los mostrados a continuación:

- Captura electrónica (ECD)
- Espectrometría de absorción atómica (AAS)
- Espectrometría de fluorescencia atómica (AFS)
- Plasma inducido por microondas (MIP-AES)
- Espectrometría de emisión atómica (AES)
- Espectrometría de masas (MS)
- Plasma acoplado inductivamente con espectrometría de masas (ICP-MS)

De forma habitual, se suele llevar a cabo el acoplamiento de un detector atómico con la columna cromatográfica a través de una interfase existiendo una gran variedad de configuraciones, las cuales poseen diversas cualidades. Una de estas propiedades, muy importante, es el límite de detección que pueden alcanzar estas técnicas híbridas, quedando resumido en la Tabla 4:

Tabla 4: Límites de detección para la especiación de mercurio en diversas técnicas híbridas

Separación	Tipo de detector	Límite de detección
GC	(CV)-AAS	5-167 pg
HPLC	(CV)-AAS	4-16 $\mu\text{g L}^{-1}$
GC	ETAAS	0,04 ng
GC	(CV)-AFS	0,01-6 ng L^{-1} ; 0,6-1,3 pg
HPLC	(CV)-AFS	0,015-0,1 μg
GC	MIP-AES	0,04-10 ng L^{-1}
HPLC	(CV)-MIP-AES	0,35 ng ml^{-1}
GC	ICP-AES	0,6 ng L^{-1} ; 3,0 pg
HPLC	ICP-AES	0,1 ng ml^{-1}
GC	ICP-MS	0,12-1 pg
HPLC	ICP-MS	16-400 ng L^{-1}

Valores procedentes de Jiménez Moreno (2008)

Como se puede apreciar, las técnicas de detección con mayor sensibilidad son espectrometría de fluorescencia atómica (AFS) y plasma acoplado inductivamente con espectrometría de masas (ICP-MS).

1.4. Técnicas de descontaminación de emplazamientos contaminados

Una vez determinada la existencia de contaminación en un suelo, el siguiente paso a llevar a cabo es la descontaminación del mismo. Así en la actualidad, existe un amplio abanico de tecnologías destinadas

a la recuperación de entornos afectados por metales pesados (Tabla 5). En función de los objetivos que se quieran alcanzar, pueden ser clasificadas de la siguiente manera (Kaifer et al., 2004):

- **Técnicas de contención** → Aquellas que aíslan el contaminante en el suelo sin actuar sobre él, normalmente a través de la aplicación de barreras físicas en el suelo.
- **Técnicas de confinamiento** → Reducen la movilidad de los contaminantes evitando de este modo su migración. Para ello se modifican las condiciones fisicoquímicas en las que se encuentran los contaminantes.
- **Técnicas de descontaminación** → Pretenden disminuir la concentración de los contaminantes en el medio.

La elección de una u otra técnica dependerá de diversos factores como son las propiedades del medio, el tipo y grado de contaminación, el coste del método, el tiempo disponible y el uso final de la zona una vez restaurada (Reddy, et al., 1999; Wuana y Okieimen, 2011).

Tabla 5: Principales técnicas de tratamiento de suelos contaminados por metales pesados

Tipo de tratamiento		Tratamiento	Aplicación
Confinamiento		Estabilización fisicoquímica	<i>Ex situ</i>
		Inyección de solidificantes	<i>In situ</i>
		Vitrificación	<i>Ex situ – In situ</i>
Contención		Barreras verticales	<i>In situ</i>
		Barreras horizontales	<i>In situ</i>
		Barreras de suelo seco	<i>In situ</i>
		Sellado profundo	<i>In situ</i>
		Barreras hidráulicas	<i>In situ</i>
Descontaminación	Fisicoquímico	Extracción	<i>In situ</i>
		Lavado	<i>Ex situ</i>
		Flushing	<i>In situ</i>
		Electrocinética	<i>In situ</i>
		Adición de enmiendas	<i>In situ</i>
		Barreras permeables activas	<i>In situ</i>
	Térmico	Incineración	<i>Ex situ</i>
		Desorción térmica	<i>Ex situ</i>
	Biológico	Biotransformación de metales	<i>In situ</i>
		Landfarming	<i>Ex situ</i>
		Biopilas	<i>Ex situ</i>
		Compostaje	<i>Ex situ</i>
		Fitorrecuperación	<i>In situ</i>

En la legislación actual, encontramos una serie de instrucciones que nos estipulan qué criterio hay que seguir en el proceso de selección de una tecnología frente a otra. Ejemplo de ello lo podemos encontrar en el Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados, donde en su artículo 7 apartado 3 se establece que: “La recuperación de un suelo contaminado se llevará a cabo aplicando las mejores técnicas disponibles en función de las características de cada caso. Las actuaciones de recuperación deben garantizar que materializan soluciones permanentes, priorizando, en la medida de lo posible, las técnicas de tratamiento *in situ* que eviten la generación, traslado y eliminación de residuos”. Es conveniente destacar dos aspectos muy importantes que han sido mencionados en dicho artículo; el primero de ellos es el concepto “mejores técnicas disponibles” el cual hace referencia a que, atendiendo a las características del escenario de contaminación, se

debe escoger aquella técnica que nos permita alcanzar los objetivos planteados de la forma más eficaz posible y que a la vez se lleve a cabo en condiciones económica y técnicamente viables. Por otro lado, la segunda idea, la cual está intrínsecamente relacionada con la primera, es la prioridad de la realización de tratamientos in situ pues gracias a ello se consigue realizar una menor destrucción y alteración del medio.

Por tanto, si atendemos a algunas de las tecnologías existentes en la actualidad, como son las barreras permeables activas, precipitación, electrocinética o el uso de membranas artificiales, su coste suele ser muy elevado, pueden producir graves alteraciones en la estructura y fertilidad del suelo y en la mayoría de los casos, suelen generar gran cantidad de desechos que son difíciles de eliminar (Rai, 2008) y por tanto no cumplen en cierta medida con los criterios expuestos anteriormente. Atendiendo a este problema, las técnicas biológicas (microbiológicas y fitorrecuperación) han nacido como alternativas para solventar algunas de las limitaciones que poseen el resto de técnicas de descontaminación.

1.4.1. Técnicas biológicas: Fitotecnologías

Como se acaba de mencionar, una de las tecnologías incluidas dentro de las técnicas biológicas es la fitotecnología, la cual consiste en el uso de plantas capaces de sobrevivir en ambientes contaminados con metales pesados o sustancias orgánicas y que a la vez pueden extraer, acumular, inmovilizar o transformar estos contaminantes presentes en el medio (Ortiz Bernad et al., 2007). Dependiendo del proceso llevado a cabo y de la parte de la planta utilizada, la fitorecuperación puede dividirse en 5 técnicas diferentes:

- **Fitoextracción:** Plantas acumuladoras de metales son utilizadas para concentrar metales preferentemente en su parte aérea y en raíces, si éstas pueden ser fácilmente extraídas.
- **Rizofiltración:** Las raíces de las plantas absorben, precipitan y concentran metales o degradan compuestos orgánicos a partir de un efluente contaminado.
- **Fitoestabilización:** La movilidad de los metales pesados se reduce con el uso de plantas tolerantes que provocan una disminución de su biodisponibilidad.
- **Fitodegradación:** Degradación de compuestos orgánicos por la acción de las plantas y los microorganismos asociadas a ellas.
- **Fitovolatilización:** Las plantas absorben contaminantes que son transformados en compuestos volátiles y posteriormente liberados a la atmósfera a través de las hojas.

Figura 15: Dibujo esquemático de diferentes técnicas de fitorremediación (Fuente: Pilon-Smits, 2005)

Algunas de las ventajas e inconvenientes de la implantación de este tipo de tecnología son expuestos en la Tabla 6. Entre sus atributos destacan su posible aplicación *in situ*, carácter respetuosos con el medio ambiente, bajo impacto visual y su reducido coste, ya que la fitorremediación es una tecnología que puede llegar a ser de media unas 10 veces más baratas en comparación con algunos métodos tradicionales de ingeniería como la excavación, lavado de suelo o “pump and treat” (Pilon-Smits, 2005). En cambio, también posee ciertas limitaciones como son: baja velocidad de descontaminación, crecimiento estacional y mayor susceptibilidad a los factores ambientales.

Tabla 6: Ventajas e inconvenientes de la tecnología de fitorremediación

Ventajas	Técnica <i>in situ</i>
	Los costes de implantación y mantenimiento suelen ser menores que la mayoría de las técnicas de descontaminación tradicionales
	Reducción/Prevención de la erosión
	Mejora de la calidad del aire y secuestro de gases de efecto invernadero
	Mejora de la estética del emplazamiento, socialmente aceptada
	La estructura del suelo y su fertilidad no son afectadas de forma negativa (incluso pueden mejorarla)
	Menor cantidad de residuo llevado a vertedero
Inconvenientes	La profundidad de las raíces limita la zona de acción
	Requiere largos periodos de tiempo para llevar a cabo la descontaminación
	Altas concentraciones de contaminantes limitan su aplicación
	Dependiente de las condiciones climáticas
	Las enmiendas y prácticas agronómicas pueden producir efectos no deseados sobre la movilidad de los contaminantes
	Posible transferencia de los contaminantes a la cadena trófica
	Precaución en el uso de especies no nativas que podrían alterar el ecosistema

Fuente: EPA (2010)

Sin embargo, si hay que mencionar otro factor que limita su implantación, ese es la variedad o número de especies que se conocen para poder ser utilizadas en descontaminación. Un ejemplo lo podemos ver en la fitoextracción, donde el número de especies de angiospermas que han sido identificadas como hiperacumuladoras de metales pesados asciende a 450, lo que supone algo menos del 0,2% de las todas las especies conocidas (Rascio y Navari-Izzo, 2011).

Por tanto, debido a que la fitorremediación es una tecnología con un gran potencial, en las últimas décadas se ha ido registrando un aumento de forma significativa de los estudios sobre este tipo de técnicas cuyo fin es aumentar el conocimiento sobre el comportamiento de las plantas ante la presencia de contaminantes, pudiendo así solventar sus diferentes limitaciones y ampliar los ámbitos en los que pueden ser aplicadas.

De este modo, para aquellos estudios que quieran llevar a cabo investigaciones sobre el uso potencial de una planta, se han de tener en cuenta una serie de premisas que son expuestas a continuación:

1. La especie a utilizar ha de ser autóctona de la zona a remediar, ya que así se asegura por un lado, que dicha planta esté adaptada a las condiciones climáticas del medio, insectos y enfermedades, y por otro lado, evita el uso de especies alóctonas o invasivas que pueden afectar a la biodiversidad local (Angle y Linacre, 2005; Gomes et al., 2014). Un ejemplo de esto último lo podemos ver en la plata de Jacinto de agua (*Eichornia crassipes*) que ha demostrado una gran capacidad para la fitorremediación debido a su rápido crecimiento y gran absorción de metales, pero que no pueden ser utilizadas debido a que es una especie muy invasiva y que además posee una rápida descomposición (Rai, 2008).
2. La planta tiene que ser capaz de tolerar las concentraciones de metales presentes en el medio en el que crece y en el caso de que se llegue a realizar una acumulación de los mismos en sus tejidos, no deben producir efectos adversos en ella.

3. La descontaminación del emplazamiento se debe conseguir de forma eficiente.

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, un aspecto muy destacable para asegurarnos de que la planta estudiada posee un gran potencial para la fitorremediación es la necesidad de realizar, además de ensayos de laboratorio, pruebas en campo. Esto es debido a que existen multitud de factores como luz, temperatura, pH, Eh, presencia de materia orgánica o fracción arcilla que son muy difíciles de recrear en condiciones controladas y pueden hacer que el comportamiento y efectos de los metales contemplados en el laboratorio difieran en gran medida de aquellos que suceden en un escenario real (Dickinson et al., 2009; Pillai, 1998).

1.4.2. Uso de macrófitas en las fitotecnologías

El uso de plantas para poder descontaminar entornos acuáticos afectados por metales pesados ha adquirido una gran relevancia, siendo la clase de plantas utilizado en ese tipo de emplazamiento las denominadas macrófitas. El término macrófita hace referencia a un grupo de organismos fotosintéticos acuáticos entre los que están incluidas las divisiones Bryophyta (musgos y hepáticas), Pteridophyta (helechos y afines) y Spermatophyta (espermatofitas). Algas del género *Cladophora* o del género *Chara* o *Nitella* son también en algunas ocasiones incluidas en la definición de macrófita (Calow, 2009).

Atendiendo a su relación con el medio edáfico y desarrollo, las macrófitas pueden ser divididas en cuatro categorías diferentes (Chambers et al., 2008):

- **Emergentes** → Plantas cuyas raíces crecen en sedimentos inundados o periódicamente inundados, y que presentan un follaje extendido en el aire (ej. *Schoenoplectus sp.*).
- **Con hojas flotantes** → Plantas enraizadas al fondo del sedimento y cuyas hojas flotan en la superficie del agua (ej. *Nuphar sp.*).
- **Sumergidas** → Plantas que crecen completamente sumergidas dentro del agua, y cuyas raíces o raíces análogas están unidas o estrechamente asociadas al sustrato (ej. *Elodea sp.*).
- **Flotantes libres** → Como su nombre indica, son plantas que flotan encima o dentro de la superficie de agua (ej. *Lemna sp.*).

Figura 16: Ejemplos de tipos de macrófitas. (A) *Schoenoplectus lacustris*; (B) *Nuphar lutea*; (C) *Lemna minor*; (D) *Elodea nuttallii*.

Las propiedades que convierten a este tipo de plantas en buenas herramientas para ser utilizadas en la fitorremediación son por un lado, la capacidad de algunas de ellas de poder acumular metales pesados en sus tejidos, y por otro lado, la capacidad de promover el desarrollo de otros procesos, tanto físicos, como químicos y biológicos que permiten la eliminación de estos compuestos del medio. En la Tabla 7 se muestran algunos ejemplos de dichos procesos:

Tabla 7: Procesos promovidos en humedales por la presencia de macrófitas

Filtración de sólidos y coloides	Formación de carbonatos
Asociación con óxidos de Fe y Mn	Reducción a formas no móviles
Formación de sulfuros metálicos insolubles	Metilación biológica

Fuente: Sobolewski (1995)

Además, a partir del conocimiento que se ha ido adquiriendo sobre las macrófitas acuáticas y su capacidad para descontaminar, se han desarrollado los denominados “humedales artificiales” los cuales consisten en la construcción de obras de ingeniería donde se favorecen los procesos que suceden en un humedal natural pero en un entorno mucho más controlado (Rai, 2009).

Especies como *Phragmites australis*, *Mentha aquatica*, *Eichhornia crassipes*, *Pistia stratiotes* son ejemplos de algunas macrófitas utilizadas para remediar sistemas acuáticos contaminados por metales como Pb, Cu, Hg, Cd, Zn o As (Chattopadhyay et al., 2011; Kamal et al., 2004; Marchand et al., 2010; Skinner et al., 2007; Veselý et al., 2011; Ye et al., 2003).

En lo referente a estudios sobre el posible uso de fitotecnologías en sistemas acuáticos en la Comarca Minera de Almadén, podemos encontrar los trabajos llevados a cabo por Millán et al. (2012, 2014) donde se realizaron la recogida de muestras de diferentes especies vegetales de ribera a lo largo del distrito, para conocer de forma preliminar el comportamiento que tenían en la acumulación de mercurio y su potencial capacidad como fitotecnología. En total fueron 5 especies las escogidas; 3 de ellas correspondían a arbustos de ribera: adelfa (*Nerium oleander*), taray (*Tamarix canariensis*) y tamujo (*Flueggea tinctoria*) y las otras dos a macrófitas acuáticas: enea (*Typha domingensis*) y carrizo (*Phragmites australis*). Una vez los resultados fueron obtenidos, se pudo observar que de entre todas las especies recogidas, la macrófita *Typha domingensis* era la que mostraba mejores indicios de poseer una alta capacidad de acumular metales pesados en sus tejidos y por consiguiente resultaba interesante realizar una investigación más exhaustiva en dicha planta y su acumulación, no sólo con el mercurio, sino también con otros metales pesados que existen en la zona. De este modo, el presente trabajo ha querido continuar con dicha idea, escogiendo a la especie *T. domingensis* como objeto de estudio.

1.4.2.1. Descripción de la planta de estudio: *Typha domingensis* Pers.

Typha domingensis Pers. (Figura 17) comúnmente conocida como enea, anea o espadaña es una planta herbácea, glabra, y erecta perteneciente a la familia *Typhaceae*. Posee hojas alternas, carnosas y de longitud variable y puede alcanzar un gran desarrollo con alturas que oscilan entre 1 y 3 metros (Flora Ibérica, 2014).

Es una planta vivaz, es decir, la parte aérea se renueva cada año siendo su sistema radicular rizomatoso el que se mantiene perenne durante todo el tiempo. Durante el periodo estival (junio - julio), se forma un tallo aéreo carente de hojas que porta en su parte apical las inflorescencias formada por dos partes espiciformes, donde la masculina de forma cónica se encuentra separada de la femenina (cilíndrica) por una porción desnuda del eje. Una vez llegado el otoño, la parte aérea senesce y se seca, siendo reemplazada por una nueva en la siguiente primavera.

Las zonas en los que comúnmente suele encontrarse esta especie son en las orillas de ríos, lagos y pantanos de regiones tanto templadas como tropicales de todo el mundo (Hickman, 1993). Su distribución se ha expandido significativamente gracias a su buena adaptación a la contaminación, condiciones reductoras del suelo, sequía y salinización (Flora Ibérica, 2014). Estas propiedades, combinadas con su gran crecimiento de biomasa, han permitido que *Typha domingensis* y otras especies de su género, sean utilizadas en humedales artificiales para descontaminar agua residuales urbanas e industriales con contenidos en metales (Hadad et al., 2010; Klink et al., 2013). Pero, a pesar de su uso extendido, el conocimiento que existe en la actualidad acerca de la capacidad de esta especie de distribuir y acumular metales en sus diferentes órganos es aun

limitado y más aún en condiciones de campo. Asimismo, uno de los metales pesados menos estudiados con dicho género ha sido el mercurio, donde además, los escasos trabajos llevados a cabo con este elemento, han sido realizados en la mayoría de los casos con la especie *Typha latifolia* y desarrollados en cultivos hidropónicos o en lagunajes artificiales (Anning et al., 2013, Willis et al., 2010). Existiendo en la actualidad, un número reducido de trabajos que hayan estudiado la acumulación de mercurio en *T. domingensis* (Gomes et al., 2014).

Figura 17: Lámina de *Typha domingensis*: a) hábito; b) cara adaxial de la vaina foliar; c) flor masculina; d) bractéolas masculinas; e) flor femenina; f) bractéolas femeninas (Fuente: Flora Ibérica, 2014)

1.5. Objetivos

De acuerdo con las premisas anteriormente expuestas, la presente tesis pretende abarcar por un lado, el estudio del comportamiento de *Typha domingensis* frente a mercurio, plomo, cobre y cinc en un entorno minero y por otro lado, la especiación de mercurio en especies vegetales. Para ello se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Estudio de la acumulación de metales pesados por *Typha domingensis* en el río Valdezogues y sus posibles usos. Para el alcance de dicho objetivo, serán necesarias las siguientes acciones:
  - a. Caracterización de los sedimentos a lo largo del río Valdezogues a su paso por la Comarca minera de Almadén
  - b. Medición de las concentraciones totales de Hg, Pb, Zn y Cu y su distribución en los diferentes órganos de la planta.
  - c. Evaluación en la eficiencia de absorción de dichos metales comparándola con la concentración disponible en el medio.
  - d. Estudio de la relación entre la acumulación de los metales en planta y en el sedimento.
2. Optimización de un método analítico para la especiación de mercurio en plantas tomando como referencia los métodos desarrollados por Berzas Nevado (2005, 2008) para sedimentos y muestras biológicas de origen animal.

Capítulo II: MATERIALES Y MÉTODOS

Debido a que en la presente tesis se han llevado a cabo dos estudios que, a pesar de ser complementarios, requieren de una serie de materiales y métodos diferentes, se ha estructurado el presente capítulo en dos subapartados independientes para poder exponer de esta manera los procedimientos desarrollados en cada uno de dichos estudios.

2.1. Materiales y métodos para la evaluación de la acumulación de metales pesados en *Typha domingensis*

2.1.1. Selección de los puntos de muestreo

El estudio sobre la acumulación de metales pesados en *Typha domingensis* fue llevado a cabo principalmente en la cuenca del río Valdezogues (Figura 18) en su tramo a lo largo del distrito minero de Almadén. Se llevaron a cabo 3 campañas de campo en los meses de mayo y junio de los años 2010, 2011 y 2013.

Durante la primera campaña (2010) fueron escogidos un total de 8 puntos de muestreo, éstos se centraban especialmente en la zona próxima a la confluencia del río Valdezogues con el río Alcudia y arroyo Azogado. Sin embargo, en los años posteriores, la cifra de puntos aumentó a un total 11, incluyéndose de este modo los nombrados en el trabajo como VZ-1, VZ-2 y VZ-3. Por tanto, las zonas de muestreo quedaron finalmente distribuidas de la siguiente manera:

- 9 puntos en el río Valdezogues (VZ-0 al VZ-8).
- 1 punto en el arroyo Azogado (AZ-1).
- 1 puntos en el río Alcudia (AL-1).

El primer punto ubicado en el río Valdezogues (VZ-0) está situado fuera del distrito minero y lejos de las principales fuentes de contaminación. Esta ubicación fue utilizada como punto control para conocer los niveles de concentración de metales antes de la entrada del río al área minera y la influencia de las emisiones atmosféricas que han tenido lugar en el distrito minero a lo largo del tiempo. Los siguientes dos puntos (VZ-1 y VZ-2) se encuentran localizados aguas arriba y aguas abajo respectivamente de la antigua mina a cielo abierto de El Entredicho. El siguiente punto (VZ-3) se emplaza antes del embalse de Castilseras y VZ-4 se localiza después de la presa y aguas arriba de la confluencia con el río Alcudia. La confluencia del Arroyo Azogado con el Río Valdezogues ocurre entre los puntos de muestreo VZ-5 y VZ-6. Cercano a VZ-7 se encuentra una mina abandonada de Pb-Zn y por último, al límite del distrito se sitúa el punto VZ-8, el cual está próximo a la antigua estación de Chillón utilizada tiempo atrás para cargar y transportar el mineral de cinabrio.

Con respecto al punto ubicado en el río Alcudia (AL-1) éste se encuentra ubicado a 600 metros de la confluencia con el río Valdezogues. Entretanto, el único punto de muestreo del arroyo Azogado (AZ-1) se localiza aproximadamente a unos 300 metros de la convergencia de dicho arroyo con el río principal.

Figura 18: (A) Localización de los puntos de muestreo en el distrito minero de Almadén. (B) Detalle de la localización de los puntos de muestreo en la confluencia del río Valdeazogues con los afluentes Alcudia y Azogado. Elaborado utilizando fotografía aérea (IGN, 2007).

Capítulo II: MATERIALES Y MÉTODOS

En cada uno de estos puntos, entre tres y cuatro individuos de *Typha domingensis* fueron muestreados, separando su parte aérea de sus partes subterráneas. Las muestras de sedimento debajo de cada planta fueron también recogidas con una pala (EPA, 2003) tan pronto como las muestras de planta eran cogidas. La profundidad de la toma de sedimentos oscilaba entre los 15 y 20 cm y su peso entre 0,5 y 1 kg. Tanto las muestras de planta como de sedimento fueron almacenadas en bolsas de plástico y posteriormente guardadas en neveras portátiles a 4 °C. En el caso de AL-1 solo fueron tomadas muestras de sedimento debido a que en dicho punto no existe presencia de *Typha domingensis*.

En el 2013 se llevó a cabo de forma adicional, la recolección de sedimento para la medición de metilmercurio, en este caso, el procedimiento llevado a cabo fue el mismo que lo descrito anteriormente, salvo que las muestras eran guardadas en botes de teflón de 250 ml que anteriormente había sido sumergidos durante 24 horas en una disolución de ácido nítrico al 10% y posteriormente aclaradas exhaustivamente con agua Milli-Q.

Tabla 8: Resumen de muestras recogidas en las diferentes campañas de campo. La casilla en color gris claro indica que se recogió muestra en dicho punto, siendo lo opuesto para aquellas casillas de color gris oscuro.

Año	Muestra	VZ-0	VZ-1	VZ-2	VZ-3	VZ-4	VZ-5	VZ-6	VZ-7	VZ-8	AZ-1	AL-1
2010	Planta											
	Sed.											
2011	Planta	*										
	Sed.											
2013	Planta											
	Sed.											

* Sólo se dispone de parte aérea

La localización de cada punto de muestreo fue registrada utilizando un sistema de GPS para poder llevar a cabo el muestreo en la misma localización cada año.

Tabla 9: Coordenadas de los puntos de muestreo (UTM – 30 N – ETRS89).

Punto	Coordenadas UTM – 30 N (m)	
	X	Y
VZ-0	359.576	4.288.246
VZ-1	354.877	4.287.970
VZ-2	352.728	4.289.010
VZ-3	346.624	4.291.381
VZ-4	338.417	4.288.420
VZ-5	337.411	4.288.146
VZ-6	337.122	4.287.983
VZ-7	336.941	4.287.774
VZ-8	336.596	4.286.404
AZ-1	337.281	4.288.231
AL-0	345.352	4.285.316
AL-1	338.802	4.287.720

2.1.2. Acondicionamiento de muestras de sedimentos y medición de parámetros fisicoquímicos

En el laboratorio, las muestras de sedimento fueron secadas al aire y posteriormente tamizadas (< 2 mm). Una vez obtenida la fracción fina, se llevaron a cabo los siguientes procedimientos:

2.1.2.1. Caracterización fisicoquímica

Los parámetros fisicoquímicos que fueron medidos en cada una de las muestras de sedimento fueron los siguientes:

- pH → Medido en una relación sedimento-agua de 1:2,5 utilizando para ello un pH-metro modelo micropH 2000 de la marca Crison.
- Conductividad eléctrica (CE) → Medido a través de un conductímetro EC-Meter Basic 30+ (Crison) en una relación sedimento-agua 1:5
- Materia orgánica (MO) → Utilizando el método de Walkey-Black.
- Textura → Basado en el método Bouyoucos (Day, 1965).

Para obtener los valores de conductividad eléctrica como pasta saturada (CE_e), los valores de CE que fueron medidos en el laboratorio en un ratio de sedimento-agua de 1:5 fueron posteriormente multiplicados por un factor que depende de la textura de la muestra. En este caso, todos los sedimentos tenían textura arenosa o franco arenosa lo que, de acuerdo con Loveday (1972) les correspondía un factor de 6,4.

2.1.2.2. Molienda y digestión de muestras de sedimento

Para la medición de las concentraciones totales de metales en los sedimentos, es necesaria la molienda previa de cada una de las muestras, utilizando para ello un mortero de ágata (RM 200, Retsch) obteniéndose de este modo un tamaño de partícula menor de 420 µm.

Posteriormente, para poder realizar la determinación de la concentración de Pb, Cu y Zn o en el caso del Hg cuando la muestra superaba el límite de detección (600 ng) del instrumental de medición, se les realizó una digestión ácida siguiendo el método EPA 3052 (EPA, 1996) con la adición de entre otros, de ácido fluorhídrico para la completa digestión de los sedimentos. Dicho proceso fue llevado a cabo en un microondas MARS 5 (CEM Corporation).

2.1.3. Extracción secuencial

Los métodos conocidos como extracción secuencial permiten conocer la distribución de los diferentes metales en las distintas fracciones del sedimento. Dichos procesos consisten en la aplicación de una secuencia de reactivos a una muestra de suelo o sedimento para poder de esta manera, extraer fracciones de metal asociado a cada uno de los componentes de la misma.

En la actualidad, existen diversos métodos de extracción secuencial como son el BCR-SES (Quevauviller et al., 1997) o el de Tessier (Tessier et al., 1979). En el presente estudio, el método escogido fue el de seis pasos según Sánchez et al. (2005), el cual está desarrollado específicamente para suelos mineros. En la Tabla 10 se exponen las diferentes fracciones que se obtienen en cada paso y el reactivo utilizado. En el Anexo I se describe de forma exhaustiva dicho proceso.

Tabla 10: Procedimiento de extracción secuencial en seis pasos desarrollada por Sánchez et al. (2005)

Fracción	Extractante
Soluble en agua	H ₂ O Milli-Q
Intercambiable	NH ₄ Cl 1 M (pH=7)
Carbonatos	Solución de Morgan (NH ₄ AC 1 N pH=4,5)
Fácilmente reducible / Oxihidróxidos amorfos de Fe y Mn	Solución de Tamm (ácido oxálico / oxalato amónico pH = 2,8)
Soluble en HCl 6 M / Oxihidróxidos cristalinos de Fe y Mn	HCl 6 M
Oxidable / Absorbido en la materia orgánica	H ₂ O ₂ (pH=2, HNO ₃) y CH ₃ COONH ₄ (pH=2, HNO ₃)
Residuo final	Agua regia / HF

2.1.4. Acondicionamiento de muestras de planta

Respecto a las muestras de planta, las partes subterráneas fueron divididas (Figura 19) en tres secciones: raíces, rizomas y una tercera que fue denominada “núcleo radicular”. Esta última fracción representa la zona de engrosamiento del rizoma en el que se registra la mayor densidad de raíces y a su vez, es también la zona a partir de la cual surgen las hojas. El motivo por el cual fue elegida esta delimitación fue para conocer el comportamiento que existe en la zona de transición entre la parte subterránea y la aérea en lo que acumulación de metales respecta.

Figura 19: Esquema de las diferentes fracciones de estudio de *Typha domingensis*
(Fuente: Elaboración propia).

Posteriormente, y con el fin de eliminar la contaminación externa, cada una de las fracciones de la planta fueron lavadas con agua desionizada en un baño de ultrasonidos (Ultrasons-H, Selecta) en programas de hasta 9 ciclos de 10 minutos cada uno (en el caso de las hojas era suficiente con 4 ciclos), limpiando los vasos y renovando el agua entre ciclo y ciclo. La cantidad de muestra introducida en cada vaso era la suficiente para evitar un solapamiento que impidiese un correcto lavado.

A continuación, una fracción de cada una de las muestras fueron puestas a secar a temperatura ambiente, mientras otra porción fue guardada en bolsas de plástico debidamente etiquetadas y almacenadas en frigorífico a la espera de ser liofilizadas (para conocer proceso de liofilización ir a apartado 2.2.2.).

Una vez secas las muestras, se procedió a su homogenización mediante un molino eléctrico (A 11, IKA) para de esta forma obtener un tamaño de partícula inferior a 420 μm . Al igual que en el caso de los sedimentos, para la medición de la concentración total de Pb, Zn y Cu en las muestras de planta, fue necesario la digestión de las mismas. En este caso, se llevó a cabo su digestión siguiendo el método expuesto por Lozano-Rodríguez et al. (1995) en un microondas MARS 5 (CEM Corporation).

2.1.5. Cuantificación de la concentración de Hg total en las muestras de planta, sedimento y extracción secuencial

Para la determinación de la concentración de Hg se utilizó un espectrofotómetro de absorción atómica específico para tal fin, el Analizador Avanzado de Mercurio (AMA-254, LECO Instruments). Dicho equipo posee un límite de detección de 0,01 ng y puede analizar tanto muestras sólidas como líquidas sin necesidad de un pretratamiento químico, únicamente se requiere su molienda para conseguir de este modo una correcta homogenización de la muestra.

Figura 20: Analizador Avanzado de Mercurio (AMA-254) ubicado en la Unidad de Conservación y Recuperación de Suelos del Ciemat

Para poder determinar la precisión y exactitud de las mediciones de mercurio total, fueron utilizados diversos materiales certificados de referencia, los cuales son expuestos en la siguiente lista:

- NCS ZC73013: Hoja de espinacas
- SRM 1573a: Hojas de tomate
- BCR-060: Planta acuática
- BCR-062: Hojas de olivo
- CRM020-050: Suelo franco arenoso
- CRM051-050: Suelo arcilloso
- SRM 2709: Suelo agrícola

Las diferencias porcentuales entre la concentración de Hg medido en el AMA-254 y el valor certificado fueron inferiores al 10%. Los valores de concentración certificados para cada uno de los materiales de referencia se encuentran recogidos en el Anexo II.

2.1.6. Cuantificación de la concentración de Pb, Zn y Cu total en las muestras de planta, sedimento y extracción secuencial

La medición de la concentración de Pb, Zn y Cu de los diferentes extractos fue llevada a cabo a través de un espectrofotómetro de absorción atómica de llama Aanalyst 700 (Perkin Elmer) con límites de detección de 0,1; 0,02 y 0,005 mg L⁻¹ para Pb, Zn y Cu, respectivamente.

Figura 21: Equipo Perkin Elmer Aanalyst 700 ubicado en la Unidad de Conservación y Recuperación de Suelos del Ciemat

Al igual que con el analizador de mercurio, se utilizaron materiales de referencia para conocer la precisión y exactitud de las mediciones de concentración total. En este caso, los patrones utilizados fueron los expuestos a continuación:

- SRM 1573a: Hojas de tomate
- BCR-060: Planta acuática
- BCR-062: Hojas de olivo
- CRM020-050: Suelo franco arenoso
- CRM051-050: Suelo arcilloso

Las recuperaciones obtenidas para las mediciones de Pb, Zn y Cu en el equipo Perkin Elmer Analyst 700 oscilaron entre el 95 y 105%. Si se desea consultar los valores certificados de cada uno de estos patrones, consultar el Anexo II.

2.1.7. Análisis estadístico

Para llevar a cabo los diversos análisis estadísticos, primero se comprobó la Normalidad y la homocedasticidad de los datos. Para ello, el test de Shapiro-Wilk y la prueba de Levene fueron utilizados. En el caso de que ambos test fuesen aceptados, se realizó a continuación un análisis de la varianza de un factor (ANOVA) para de esta manera evaluar la existencia de diferencias significativas en la concentración de cada uno de los metales entre las diferentes partes de la planta. Para conocer exactamente entre qué partes de la planta existían dichas diferencias se hicieron la prueba post hoc de Tukey. En aquellos casos, donde existiese una ausencia de homocedasticidad, el test Welch era aplicado seguido a su vez del test Games-Howell.

En aquellas variables donde no se seguían una distribución Normal, se llevó a cabo la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis acompañada del test U de Mann-Whitney.

También fueron estudiadas las posibles correlaciones que pudieran existir por un lado, entre las concentraciones de Hg, Pb, Cu, y Zn acumulados en los diferentes órganos de la planta con las concentraciones de estos mismos elementos presentes en el medio y por otro lado, asimismo se analizaron aquellas relaciones que pudieran haber entre las distintas partes de la planta entre sí. Para ello, se llevó a cabo el coeficiente de Pearson cuando el test de normalidad de Shapiro-Wilk era aceptado, en caso contrario, se realizó la prueba no paramétrica de Tau-b de Kendall.

Las pruebas con probabilidades de 0,05 o menores fueron consideradas como significativas salvo en el caso del test U de Mann-Whitney donde la probabilidad viene determinada por $\alpha = 0,05/k$ donde k es el número de pares de variables a comparar.

Todos estos análisis estadísticos fueron realizados utilizando el paquete estadístico SPSS 19.0 (IBM Company, 2010).

2.2. Materiales y métodos para la optimización del método analítico de especiación de mercurio en plantas

Los ensayos para el desarrollo y optimización de un método analítico para la especiación de mercurio en plantas, fueron realizados en los laboratorios del Departamento de Química Analítica y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Ciencias Ambientales y Bioquímica de la Universidad de Castilla-La Mancha en su Campus de la Fábrica de Armas (Toledo). Los subapartados expuestos a continuación detallan los materiales y métodos aplicados para el estudio y desarrollo de dicho método analítico.

2.2.1. Limpieza de material

Debido a que la determinación de la concentración de metilmercurio se lleva a cabo a nivel de ultratrazas, la limpieza del material que vayamos a utilizar es un factor muy importante a tener en cuenta para evitar de esta forma posibles contaminaciones que interfieran en la correcta medida del analito.

En este caso, el material de laboratorio utilizado (vidrio y teflón) era primeramente lavado con solución jabonosa, enjuagándose posteriormente con agua y después con agua ultrapura. Después, dicho material era sumergido en una solución de ácido nítrico al 10% v/v durante al menos 24 horas. Transcurrido ese tiempo, el material se enjuagaba cuidadosamente con agua Milli-Q y era introducido en una cabina de flujo

laminar hasta quedar completamente seco. Una vez secado, era introducido posteriormente en bolsas dobles de plástico limpias hasta su próximo uso.

2.2.2. Preparación de las muestras para la especiación de mercurio

Para mejorar la homogeneidad y conservación de las muestras que van a ser utilizadas en análisis de especiación, se recomienda que su secado se realice mediante el proceso de liofilización (Bloom, 1993).

Es importante tener en cuenta que en los procesos de liofilización de muestras biológicas puede existir el riesgo de pérdida de elementos volátiles o la degradación de proteínas asociadas a metales. Para evitar este efecto, uno de los factores más importantes es la velocidad de congelación en la etapa de liofilización ya que, cuando se realiza una congelación rápida se generan pequeños cristales de agua en los tejidos de la muestra, pero en el caso de que la congelación fuese lenta ocurre todo lo contrario, los cristales que se desarrollan suelen ser un tamaño mayor, lo que puede provocar que se dañe la membrana celular, modificando la estructura de la muestra y permitiendo que se produzca una interacción diferente entre Hg y la materia orgánica y por consiguiente la posible pérdida de analito (Schmidt et al., 2013).

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se llevó a cabo la liofilización de parte de las muestras que fueron previamente lavadas (apartado 2.1.4.) utilizando para ello un liofilizador LyoQuest -55 (Telstar) y cuyo programa se dividía en dos etapas:

1. Congelación ultrarrápida hasta alcanzar los -50°C y mantenimiento durante dos horas.
2. Continuando a -50°C , se realiza un vacío a 0,2 mbar de presión con una duración de 24 horas.

Figuras 22 y 23: (Izq.) Fotografía del liofilizador LyoQuest -55. (Der.) Detalle de las bandejas de carga del liofilizador

La pérdida del porcentaje de agua era calculada pesando las muestras antes y después de ser liofilizadas. Posteriormente, las muestras eran guardadas en desecadores hasta su utilización para asegurarnos de este modo que se mantenían sus niveles de sequedad y a la vez se evitaba que pudieran ser contaminadas de forma externa.

2.2.3. Procedimientos del método de especiación de mercurio

Los diferentes ensayos que se han llevado a cabo para el desarrollo del método analítico de especiación de Hg en plantas se han basado en dos procedimientos existentes previamente; uno para la determinación de metilmercurio en sedimentos (Berzas Nevado et al., 2008) y el otro para la especiación de Hg en muestras biológicas de origen

Capítulo II: MATERIALES Y MÉTODOS

animal (Berzas Nevado et al., 2005). Las mayores diferencias entre dichos métodos ocurren principalmente en la etapa de extracción, donde los reactivos utilizados y el programa de temperaturas de microondas son distintos. En la Tabla 11 se puede observar una comparativa de las etapas de extracción y derivatización para cada tipo de muestra.

Tabla 11: Esquema de métodos para especiación de Hg en muestras biológicas (Berzas Nevado et al., 2005) y sedimento (Berzas Nevado et al., 2008)

	Variable	Tipo de muestra	
		Sedimento	Matriz biológica
		1,0	0,2
Extracción	Cantidad de muestra (g)	1,0	0,2
	Reactivo	HNO ₃ 6 M – 10 ml	TMAH 25% (m/v) – 2 ml Agua milli-Q – 8 ml
Extracción	Temperatura - Tiempo	T ^a ambiente – 80 °C - 5 min	T ^a ambiente – 180 °C - 10 min
	• Etapa 1: • Etapa 2:	80 °C – 5 min	180 °C – 10 min

Centrifugación – 5 min a 3.000 r.p.m.

Derivatización	Tampón	AcOH/AcO ⁻ 1 M – 5 ml	AcOH/AcO ⁻ 1 M – 5 ml
	pH	3,9	3,9
	Ajuste pH	NH ₃	HCl
	Reactivo de etilación	NaBEt ₄ 3% (m/v) – 0,5 ml	NaBEt ₄ 3% (m/v) – 0,5 ml
	Extracción	Hexano – 2 ml	Hexano – 2 ml

Agitación manual – 10 min

Centrifugación – 5 min a 3.000 r.p.m.

Fase orgánica → Medición

Fase acuosa → Desecho

En las siguientes secciones se van a exponer cada una de las etapas, realizando una diferenciación en aquellos aspectos que sean distintos para cada tipo de muestra.

2.2.3.1. Extracción

El primer paso consiste en la extracción del metilmercurio presente en las muestras y su transferencia a una fase líquida. Es una etapa muy importante ya que hay que extraer las diferentes especies de mercurio preservando en todo momento su forma química.

Dicha fase consiste en la pesada de una pequeña cantidad de la muestra en tubos de teflón, a los que posteriormente se les añade agente extractante (HNO₃ 6 N en el caso de los sedimentos y TMAH para muestras biológicas). Añadidos los reactivos y una vez cerrados los tubos, éstos son introducidos en un microondas modelo Ethos Plus (Milestone, Inc.) eligiendo el tiempo y la temperatura adecuados para cada tipo de muestra.

Figuras 24 y 25: (Izq.) Microondas Ethos Plus (Milestone, Inc.). (Der.) Vaso preparado para ser introducido en el microondas

Una vez acabadas las etapas de calentamiento y posterior enfriamiento, el contenido de los vasos es transferido a tubos de vidrio los cuales seguidamente, son centrifugados durante 20 min a 3.000 r.p.m. para de esta manera poder obtener el agente extractante sin restos de muestra sólida.

2.2.3.2. Derivatización

Debido a que la técnica de separación a utilizar es la cromatografía de gases, es necesario que los analitos que han sido previamente extraídos se transformen en especies volátiles a través de un proceso de derivatización.

Para ello, en un vial de cristal de 22 ml al que previamente se le han añadido 5 ml de disolución tampón de ácido acético/acetato sódico 0,1M a pH 3,9, se vierten 2 ml de extracto. Debido al carácter ácido o básico del extracto obtenido, la disolución tampón no es capaz de mantener el pH de 3,9 por lo que es necesario realizar un ajuste hasta alcanzar de nuevo dicho valor antes de poder continuar con el procedimiento ya que es el pH adecuado del medio para llevar a cabo la derivatización. Así, los reactivos utilizados para el ajuste de pH fueron amoníaco para subir el pH y ácido clorhídrico o acético para bajarlo.

Por otro lado, se realiza de forma paralela la preparación de los patrones de Hg^{2+} y CH_3Hg^+ que van a ser utilizados en la etapa de medición. Para ello, se cogen dos viales con 5 ml de solución tampón y se les añade, a partir de soluciones madre de cada uno de estos compuestos previamente preparadas, volúmenes determinados, para de este modo obtener concentraciones finales de $25 \mu\text{g L}^{-1}$ en el caso de mercurio inorgánico y $15 \mu\text{g L}^{-1}$ para el monometilmercurio.

Una vez ajustado el pH (a los patrones no es necesario), se adicionan a cada uno de los viales 2 ml de hexano y 0,5 ml de reactivo de etilación, el cual en este caso es tetraetilborato de sodio ($\text{NaB}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$) al 3%. Posteriormente, los viales son agitados manualmente durante 10 minutos y centrifugados durante otros 5 minutos a 600 g. Finalmente, se obtienen dos fases (acuosa y orgánica), la fase orgánica situada en la parte superior es retirada y recogida en viales de 2 ml siendo conservados en congelador (-20°C) hasta su medición.

2.2.3.3. Limpieza

Cuando una muestra posee altos niveles de mercurio inorgánico como puede suceder en el caso de los sedimentos, pueden surgir dos inconvenientes que afectan a la determinación de la concentración de metilmercurio (Berzas Nevado et al., 2008):

1. Interferencia en la separación cromatográfica, ya que el pico correspondiente al mercurio inorgánico puede ser tan grande que enmascare la señal del monometilmercurio.
2. Generación artificial de monometilmercurio.

Para ello, es necesario realizar un proceso de limpieza previo a la derivatización para eliminar parte del mercurio inorgánico presente en el extracto. Los estudios llevados a cabo por Berzas Nevado et al. (2008) determinaron que las condiciones óptimas de limpieza para sedimentos consisten en adicionar 1,5 ml de diclorometano (CH_2Cl_2) y 100 μl de HCl concentrado a 3 ml de extracto de sedimento en HNO_3 6 N. Posteriormente se realiza una agitación y separación por fases, recogiendo la fase orgánica y volviendo a repetir el mismo proceso a la fase acuosa para de esta manera asegurarnos una recuperación completa del metilmercurio.

2.2.3.4. Preconcentración

En aquellos casos en los que las concentraciones de metilmercurio en las muestras son muy bajas, es necesario recurrir a una etapa de preconcentración para de este modo alcanzar niveles detectables en el sistema GC-pyro-AFS.

Este método consiste en someter a los extractos etilados de las muestras a evaporación por medio de una corriente de nitrógeno hasta alcanzar un volumen muy pequeño del extracto sin llegar a eliminar por completo el disolvente. El volumen final del extracto se calcula por pesada.

2.2.3.5. Separación y detección

Para la determinación de las especies de mercurio se ha utilizado un sistema acoplado GC-pyro-AFS (Figura 26) que consta de:

- **Cromatógrafo de gases GC 2010 de Shimadzu** compuesto por:
  - Inyector automático modelo AOC-20i de Shimadzu.

- Columna capilar de J&W Scientific (Agilent Technologies) de 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno (tipo “narrowbore”) y una fase estacionaria DB-5 (95 % dimetilpolisiloxano, 5 % fenilmetilsilicona) de 0,25 μm de espesor. Intervalo útil de temperatura es -60 °C a 325 °C.
- Gas portador: Helio
- **Unidad pirolizadora** compuesto por un tubo de cuarzo introducido en una cámara de calentamiento cuya temperatura regulable puede alcanzar hasta los 1000 °C. (Microbeam S.A.)
- **Sistema de fluorescencia atómica** Millenium Merlin modelo 10.025 (P.S.Analytical Ltd.) que consta de:
  - Espectrómetro de fluorescencia atómica
  - Gas portador: Argón
  - Sistema informático SAMS (Speciation Application Millenium Systems) para la adquisición de la señal analítica.

Figura 26: Acoplamiento instrumental para la especiación de mercurio
(Fuente: Jiménez Moreno, 2008)

El procedimiento para realizar la determinación de los analitos consiste en:

1. Las muestras obtenidas de la fase de derivatización son introducidas en el cromatógrafo gracias al inyector automático. Una vez inyectadas, las muestras son evaporadas y, a través de una corriente de helio (3 ml min^{-1}), son arrastradas hacia la columna cromatográfica donde se realiza la separación de especies aplicándose el siguiente programa de temperatura:
  - a. Mantenimiento de la temperatura a 40 °C durante 2,5 min.
  - b. Aumento de la temperatura de 20 °C min^{-1} hasta alcanzar una temperatura de 90 °C y posterior aumento con una pendiente de 100 °C min^{-1} hasta 200 °C.

- c. Mantenimiento de la temperatura durante 1 min a 200 °C (de esta manera nos aseguramos el arrastre de todos aquellos compuestos que puedan haberse quedado retenidos en la columna).
2. El final de la columna capilar se encuentra conectado a un pirolizador al que, a medida que van llegando las diferentes especies de mercurio, su alta temperatura (800 °C) hace que se transformen a mercurio elemental.
3. La corriente de helio con mercurio metálico es reforzado con un flujo de gas argón (150 ml min⁻¹) hacia un detector de fluorescencia atómica.
4. Las señales emitidas por el detector quedan registradas a través del programa informático y las especie químicas son identificadas según su tiempo de retención.

En la tabla se muestran de forma resumida los diferentes parámetros del sistema GC-pyro-AFS utilizado.

Tabla 12: Parámetros del acoplamiento GC-pyro-AFS

Cromatógrafo de gases	
Columna	DB-5, 30m x 0,25mm x 0,25 µm
Tipo de inyector	Split/Splitless
Volumen de inyección	2 µL (en Splitless)
Temperatura de inyección	300 °C
Programa de temperaturas	40 °C (2,5 min), 20 °C min ⁻¹ hasta 90 °C, 100 °C min ⁻¹ hasta 200 °C (1 min)
Flujo de gas portador (helio)	3 ml min ⁻¹
Pirolizador	
Temperatura de pirólisis	800 °C
Detector	
Flujo gas de refuerzo (argón)	150 ml min ⁻¹
Flujo de gas envolvente (argón)	300 ml min ⁻¹
Ganancia	1000
Factor de filtro	16

2.2.3.5.1. Cuantificación de la señal cromatográfica

Existen diferentes métodos para la cuantificación de la señal obtenida a través de la cromatografía como son el método del estándar interno, el método de la calibración absoluta o relativa y, el método de intercalación de patrones y muestras. Para el presente trabajo, el procedimiento utilizado ha sido el de intercalación de patrones y muestras. Este método se basa en el hecho de que las áreas y concentraciones están únicamente relacionadas por un factor de respuesta K al considerarse la ordenada en el origen despreciable. De esta forma, la cuantificación se realiza gracias a la elaboración de dos patrones (P₁ y P₂) con una concentración conocida de las especies a estudiar (mercurio inorgánico y metilmercurio), los cuales son inyectados de forma intercalada entre las inyecciones de las muestras. De esta forma se consigue conocer la concentración de la muestra a través de la relación existente entre el área del pico del analito en la muestra y el factor de respuesta obtenido por los patrones inyectados antes y después de la muestra.

En el presente estudio se decidió llevar a cabo tres veces la inyección de una misma muestra entre la inyección de un patrón y otro.

$$\begin{aligned} \text{Área}_{p1} &= K_1 \cdot C_1 \\ \text{Área}_{p2} &= K_2 \cdot C_2 \end{aligned} \rightarrow K = \frac{K_1 + K_2}{2} \rightarrow \text{Área}_{\text{muestra}} = K \cdot C_{\text{muestra}}$$

Capítulo III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se va a realizar la exposición de los principales resultados obtenidos durante la realización de la presente tesis. Para ello, se presentarán en primer lugar aquellos resultados referidos al estudio de la acumulación de metales en *Typha domingensis* y a continuación se mostrarán los relacionados con el método analítico de especiación de metilmercurio en plantas.

3.1. Estudio de la acumulación de metales en *Typha domingensis* en el distrito minero de Almadén

3.1.1. Sedimentos

3.1.1.1. Caracterización fisicoquímica de los sedimentos

Como se mencionó anteriormente en el apartado de materiales y métodos, la caracterización fisicoquímica de los sedimentos se llevó a cabo a través de la medición de su pH, conductividad eléctrica, textura y materia orgánica. En los siguientes apartados se realiza una descripción de los resultados obtenidos en cada uno de los parámetros medidos, pudiendo consultarlos de forma detenida en el Anexo III.

— pH

La acidez de un suelo o sedimento juega un rol fundamental en la solubilidad y movilización de los metales pesados y por consiguiente en su disponibilidad para las plantas (Muhammad et al., 2012; Zeng et al., 2011). Esto es debido a que el pH afecta tanto a la carga superficial de las arcillas, como a la materia orgánica y a los oxihidróxidos de Fe, Mn y Al y además, influye en los procesos de complejación con la materia orgánica, en las reacciones de precipitación-disolución, en las reacciones redox y en la dispersión de coloides (Lázaro, 2008).

Figura 27: Variación de pH en los sedimentos a lo largo del río Valdeazogues

Tabla 13: Valores porcentuales de pH en los sedimentos recogidos a lo largo del distrito minero de Almadén y su clasificación de acuerdo con USDA (1993)

Clasificación	Valor	%
Extremadamente ácido	3,5 – 4,4	6,7
Muy fuertemente ácido	4,5 – 5,0	3,3
Fuertemente ácido	5,1 – 5,5	20,0
Moderadamente ácido	5,6 – 6,0	26,7
Ligeramente ácido	6,1 – 6,5	30,0
Neutro	6,6 – 7,3	10,0
Ligeramente alcalino	7,4 – 7,8	3,3

En el presente trabajo, los valores de pH obtenidos en cada una de las muestra de sedimento son mostrados en la Figura 27. Aproximadamente, el 75% de estos valores oscila entre 5,1 y 6,5 (Tabla 13), estando clasificados entre fuertemente ácido y ligeramente ácido de acuerdo con la USDA (1993). Si bien, no se observaron patrones que indiquen la existencia de algún tipo de perturbación sobre el medio como pueda ser un drenaje de mina, que pueda alterar en gran medida la acidez del sedimento. Los valores de pH registrados son, en la mayoría de los casos, muy propicios para la disponibilidad tanto del Hg, como del Pb, Zn y Cu ya que la biodisponibilidad de estos metales empieza a incrementar a medida que la acidez aumenta a partir de 6,5 (Adriano, 2001).

Comparando dichos resultados con los obtenidos por otros estudios en la Comarca de Almadén, se observa que, en el caso del trabajo desarrollado por Berzas Nevado et al. (2003), donde muestras de sedimentos fueron recogidas a lo largo del río Valdeazogues en el año 1997, mostraron valores de acidez con una media de $6,7 \pm 1,0$, pese a que en aquella época la explotación minera aún se encontraba en activo, si bien ninguno de los puntos de muestreo estaban ubicados cerca de minas. Resultados similares fueron obtenidos por el estudio llevado a cabo por García-Ordiales (2014a) en el que sedimentos recogidos durante el mismo periodo de tiempo de la presente tesis (2011 y 2013) mostraron valores de pH entre 6,4 y 7.

— Conductividad eléctrica (CE)

La presencia de un alto contenido en sales, es otro factor que puede afectar al desarrollo de las plantas, ya que pueden producirse daños moleculares en las células vegetales que conllevan al estrés hiperosmótico o la alteración de la homeostasis (Sobhanian et al., 2011). Además, un incremento en la salinidad puede también generar un aumento en la movilidad de los metales en el medio. Dicho fenómeno es debido a dos procesos: 1) Complejación de los aniones de la sal con los metales pesados y 2) Competición de los cationes derivados de la sal con las especies de metales pesados cargadas positivamente en las zonas de intercambio de la fase sólida. Si bien es cierto que la intensidad de dichos procesos dependerá tanto del tipo y cantidad total de metal presente en el medio, como del tipo y cantidad de sal que provoca la salinización (Acosta et al., 2011; Zhao et al., 2013).

Un método rápido para conocer la presencia de sales en un medio es a través de la medición de su conductividad eléctrica. Como se nombró en el capítulo 2.1.2.1., se realizó la medición de la conductividad eléctrica a cada una de las muestras de sedimento recogidas, y de acuerdo con su textura se adaptó a valores en pasta saturada, los cuales son expuestos en la Figura 28 y Tabla 14:

A la vista de los resultados, los sedimentos estudiados mostraron en la mayoría de los casos un carácter no salino ($< 2 \text{ dS cm}^{-1}$) de acuerdo con Schoeneberger et al. (2012). Si bien, algunas muestras presentaron una naturaleza ligeramente salina, aunque éstas no llegaron a repetirse todos los años y que puede estar relacionada con la disminución del pH en dichos puntos que provocaría un aumento en la disolución de las sales.

Ante esta situación, la presencia de sales en el medio no debería ser considerada un elemento importante que afectase a la movilización de los metales pesados de la zona ni tampoco un factor limitante para el correcto desarrollo de *Typha domingensis* (aunque cabe recordar que este tipo de especie está adaptada a ambientes con una alta salinidad).

CEe

Figura 28: Variación de conductividad eléctrica en los sedimentos a lo largo del río Valdeazogues

Tabla 14: Valores porcentuales de conductividad eléctrica en los sedimentos recogidos a lo largo del distrito minero de Almadén y su clasificación de acuerdo con Schoeneberger et al. (2012)

Clasificación	Valor (dS m ⁻¹)	%
No salino	0 – 2	83,3
Muy ligeramente salino	2 – 4	10,0
Ligeramente salino	4 – 6	6,7

— Materia Orgánica

La materia orgánica es un componente destacado en la retención de metales pesados en un suelo o sedimento, algunos elementos como Co, Cu, Hg, Pb y Zn muestran una alta afinidad por la misma. La materia orgánica posee la capacidad tanto de realizar intercambio de cationes como de complejarlos (Lázaro, 2008; Zeng et al., 2011).

Los porcentajes de materia orgánica obtenidos en las diferentes campañas de campo se encuentran representados en la Figura 29 y resumidos en la Tabla 15. En este caso, aproximadamente el 87% de las muestras poseen porcentajes inferiores al 1%, que, de acuerdo con la EPA (1991) son clasificados como bajos o muy bajos, siendo sólo en el caso de VZ-1 donde ambos valores son superiores al 2%. Estas bajas cantidades de materia orgánica coinciden con lo esperado para regiones semiáridas de climas mediterráneos (Porta et al., 1999).

MO

Figura 29: Variación del porcentaje de materia orgánica en los sedimentos a lo largo del río Valdeazogues

Tabla 15: Proporción de los porcentajes de materia orgánica en los sedimentos recogidos a lo largo del distrito minero de Almadén clasificados de acuerdo con EPA (1991)

Clasificación	Valor (% MO)	% de muestras
Muy bajo	< 0,5	50,0
Bajo	0,5 – 1,0	36,7
Moderadamente bajo	1,0 – 2,0	3,3
Medio	2,0 – 4,0	10,0
Alto	> 4,0	0,0

3.1.1.2. Concentración total de metales

En los siguientes apartados se mostrará un análisis sobre la variación de la concentración de Hg, Pb, Zn y Cu en los sedimentos a lo largo del río. Para una consulta más detallada acerca de estos datos, puede visitarse el Anexo III.

— Mercurio (Hg)

La Figura 30 muestra la evolución de la concentración del mercurio total de los sedimentos a lo largo del río Valdezogues y sus afluentes. Como se puede observar, existe una gran variedad en dichos valores, oscilando entre $0,77 \pm 0,01$ y 724 ± 39 mg kg⁻¹ de Hg. Las concentraciones más bajas corresponden a los puntos control VZ-0 y AL-1, los cuales hay que recordar que son los únicos que se encuentran ubicados fuera del distrito minero de Almadén. Sin embargo, estas concentraciones pueden incluso interpretarse como altas ya que, de acuerdo con FOREGS (2005), la concentración mediana de Hg en sedimentos en Europa se ubica en 0,04 mg kg⁻¹, mientras que Adriano (2001) expone que los niveles de Hg presentes en zonas no contaminadas raramente superan los 0,1 mg kg⁻¹ de Hg. Este hecho es un claro ejemplo del impacto que siglos de actividad minera han provocado sobre la zona.

Mientras, en el resto de los puntos de muestreo, se puede observar que la concentración de Hg depende de su localización y proximidad a minas. Un ejemplo de ello se puede observar en el punto VZ-2 donde se experimenta un incremento en los niveles de mercurio (Figura 30b) una vez que el río Valdezogues ha cruzado la mina de cielo abierto de “El Entredicho”, en cambio, en el siguiente punto de muestreo (VZ-3) localizado a 9,5 km aguas abajo, la concentración de Hg disminuye de media un 50%, posiblemente influenciado por la existencia de meandros y remansos que permiten que los materiales arrastrados puedan precipitarse.

Sin embargo, los mayores valores de Hg en sedimento son registrados en el arroyo Azogado (AZ-1) y todas las localizaciones del río Valdezogues situadas aguas abajo de la confluencia con este arroyo (VZ-6, VZ-7 y VZ-8) como se puede apreciar con más detenimiento en la Figura 30c. Dichas concentraciones son entre 63 y 226 veces superiores a las registradas en VZ-0 para un mismo año (aunque la diferencia en los valores entre dicho punto y AZ-1 en el 2010 llega a ser 513 veces). En este caso, la principal causa acerca del incremento de la concentración de Hg, proviene de los materiales que son arrastrados por el arroyo Azogado desde la mina de Almadén, su complejo metalúrgico y escombrera, siendo un claro elemento perturbador del medio.

Si comparamos estos resultados con los obtenidos por Hildebrand et al. (1980) para sedimentos muestreados entre 1976 y 1977, encontramos que para dicho periodo, existía una tendencia similar a lo largo del río Valdezogues, aunque en este caso las concentraciones eran muy superiores a las registradas en el presente estudio, debido en gran parte a que durante dicha época aún existía cierta actividad minera. A modo de ejemplo vemos que las concentraciones en puntos de muestreo similares a AZ-1 y VZ-6 alcanzaban 970 ± 287 y 1085 ± 681 mg kg⁻¹ respectivamente, pudiendo llegar a suponer hasta 5 veces más concentración que la obtenida en los sedimentos analizados para el presente trabajo, dependiendo del año de muestreo. Así, hechos como el cese de las explotaciones en el año 2004 y los trabajos de recuperación desarrollados en la mina de “El Entredicho” (ahora transformada en un lago artificial) y en la escombrera de la mina de Almadén, han generado una disminución en la liberación de Hg al medio acuático (Berzas Nevado et al., 2003).

Figura 30. a) Evolución de la concentración total de Hg en sedimentos a lo largo del río Valdezogues. b) Detalle de la variación de la concentración de Hg en sedimentos entre recogidos en los puntos VZ-0 y VZ-5. c) Detalle de la variación de la concentración de Hg en los sedimentos recogidos entre los puntos de muestreo VZ-5 y VZ-8

— Plomo (Pb)

La distribución de plomo en el río Valdezogues se muestra en la Figura 31. Los valores obtenidos en el punto de muestreo situado fuera del distrito minero (VZ-0) son de 54 ± 9 mg kg⁻¹ en el año 2010, y 29 ± 8 y 23 ± 4 mg kg⁻¹ en los años 2011 y 2013 respectivamente. Si los comparamos con las medianas de concentración de sedimentos a nivel europeo y nacional, cuyos valores son de 20,6 y 22,5 mg kg⁻¹, respectivamente (FOREGS, 2005; IGME, 2012), observamos que en dos de los tres años de medición, las concentraciones se encuentran muy próximas a estos valores, al igual que las encontradas por García-Ordiales (2014a,b) para el mismo periodo de tiempo (26 ± 4 mg kg⁻¹). Por lo tanto, este hecho permite suponer que en el punto VZ-0 no ha existido un impacto tan destacado por Pb, a diferencia de lo que se pudo observar anteriormente en el caso del mercurio.

Dejando atrás VZ-0, y continuando a lo largo del curso del río, las concentraciones medias de Pb entre los puntos VZ-1 y VZ-5 no experimentaron grandes oscilaciones. Sin embargo, y al igual que en la distribución del Hg, los mayores valores se registraron en el arroyo Azogado y en aquellos puntos situados después de su confluencia. El margen que guardan estas concentraciones con las medidas en VZ-0 para un mismo año varía entre 2,5 y 10 veces. El origen de estas altas concentraciones proviene de los aportes terrígenos procedentes tanto de las minas de Pb-Zn situadas en el margen derecho del arroyo, como por los de las minas de Nuestra Señora de la Encarnación y San José-Andrea ubicadas cerca de los puntos VZ-6 y VZ-7 en su margen izquierdo (García-Ordiales, 2014a, b).

La información relativa a la concentración de Pb y otros metales pesados diferentes al Hg en sedimentos de la Comarca Minera de Almadén es muy limitada, pudiéndose encontrar algunos datos pertenecientes a una campaña realizada por Instituto Geológico Minero en el año 1984. En ella se observa que los valores de Pb en los sedimentos a lo largo del río Valdezogues seguían una tendencia similar al del presente estudio.

Figura 31: Evolución de la concentración total de Pb a lo largo del río Valdeazogues

— Cinc (Zn)

La Figura 32 muestra la variación de la concentración de cinc en los sedimentos a lo largo del río, de este modo se puede observar que los valores obtenidos fueron en todos los casos (incluido VZ-0) superiores a los de la mediana europea (71 mg kg^{-1}) y nacional (57 mg kg^{-1}) salvo en VZ-5 con un valor medio de $59 \pm 14 \text{ mg kg}^{-1}$ (FOREGS, 2005; IGME, 2012).

Figura 32: Evolución de la concentración total de Zn a lo largo del río Valdeazogues

Por otro lado, y debido a que el Zn se presenta en los yacimientos de forma conjunta con el Pb, era de esperar que éste mostrara un comportamiento similar al descrito anteriormente con el plomo, sin embargo, esto no llega a suceder exactamente, pues los mayores valores se registraron únicamente en VZ-7 y VZ-8, no existiendo influencia destacable de las minas ubicadas cerca del arroyo Azogado.

— Cobre (Cu)

De los metales estudiados, el cobre es el metal que menor intervalo ha presentado entre su máximo y mínimo (Figura 33), situándose casi todos los valores entre los 20 y 45 mg kg^{-1} , aunque éstos son superiores a la mediana europea, situada en 17 mg kg^{-1} (FOREGS, 2005) y la nacional, ubicada en $16,6 \text{ mg kg}^{-1}$ (IGME, 2012). Sin embargo, dichos resultados coinciden con los obtenidos por García-Ordiales et al. (2014a), y cuyo autor defiende que la inexistencia de valores atípicos y el estrecho rango en el que oscilan las concentraciones, es un indicativo de que el origen del cobre es natural y el impacto antrópico es muy bajo.

Figura 33: Evolución de la concentración total de Cu a lo largo del río Valdezogues.

3.1.1.3. Extracciones secuenciales

Las proporciones medias de las diferentes fracciones de la extracción secuencial para cada metal en cada punto de muestreo son expuestas en las Figuras 30, 31, 32 y 33 (para conocer los valores numéricos referidos a los años 2010 y 2011 consultar el Anexo III). En primer lugar, podemos observar que en la distribución del mercurio en el sedimento (Figura 34) existe una alta preferencia a estar asociado a oxihidróxidos de Fe y Mn, aunque la fracción residual correspondiente a los sulfuros, va adquiriendo una mayor relevancia a medida que se realiza el avance a lo largo del río. Además, otro aspecto muy destacable, es la asociación del mercurio con la materia orgánica, ya que dicha fracción oscila entre el 1,7 y 12,7% con un valor medio que ronda el 7% para los sedimentos que se encuentran dentro del distrito. Este dato es bastante interesante ya que, como se vio anteriormente, el porcentaje en materia orgánica de los sedimentos es muy bajo pero sin embargo pueden llegar a realizar un papel muy importante en la retención de mercurio gracias a la alta afinidad que posee este metal con los grupos -SH de la materia orgánica (Fitzgerald y Lamborg, 2007; Reddy y DeLaune, 2008; Sanei et al., 2014).

Figura 34: Distribución porcentual media de Hg en sedimento (Las recuperaciones obtenidas mediante la suma de concentraciones de cada fracción con respecto a la concentración total fueron mayores del 85%).

El hecho de que en la mayoría de los casos, más del 99% del mercurio presente en el sedimento se encuentre asociado a las tres últimas fracciones de la extracción secuencial y por tanto, a las más resistentes, va a determinar en gran medida la cantidad de mercurio que se encuentra disponible para el medio.

Se considera fracción disponible de un metal, a aquella concentración que potencialmente puede ser absorbida por las plantas. En el caso de la extracción secuencial, la suma de las fracciones soluble en agua e intercambiable es considerada la concentración fácilmente disponible. Dicha concentración varía en los sedimentos de estudio entre el 0,01 y 0,16 mg kg⁻¹, lo que en porcentaje representa entre el 0,06 y 0,44% del mercurio total del sedimento. Al igual que en el caso del mercurio total, los máximos valores de concentración

disponible fueron en general encontrados en los puntos de muestreo localizados en el arroyo Azogado (AZ-1) y todos aquellos situados aguas debajo de su confluencia con el Valdeazogues (VZ-6 a VZ-8).

Pb

Figura 35: Distribución porcentual media de Pb en sedimento (Las recuperaciones obtenidas mediante la suma de concentraciones de cada fracción con respecto a la concentración total fueron mayores del 85%).

En el caso del plomo, su distribución presenta ciertos cambios con respecto a la del mercurio (Figura 35). Se aprecia que existe una predominancia en la unión con los óxidos de Fe y Mn (tanto amorfos como cristalinos) y por el residuo final, aunque dicha fracción va perdiendo importancia a medida que se discurre por el río. De este modo, las tres últimas fracciones representan en la mayoría de los casos entre 53 al 68% del plomo con una media de 59%. También cabe destacar la existencia de un alto porcentaje de la fracción carbonatos, cuya procedencia es asumible que se deba a la presencia en el entorno de minerales de cerusita (PbCO_3). Con respecto a la fracción disponible no se pudo determinar ya que, en la mayoría de las mediciones llevadas a cabo ésta fue inferior al límite de detección del equipo ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$).

En el gráfico relativo al cinc (Figura 36) se observa de forma muy clara que existe una predominancia de dicho metal por los óxidos cristalinos de Fe y Mn con porcentajes que oscilan entre el 70 y el 87%, quedando el resto del cinc relegado a las fracciones de carbonatos, óxidos amorfos y sulfuros. La cantidad disponible para las plantas representa entre el 0,4 y 6,8% del Zn total presente en los sedimentos, lo que en concentración se traduce entre $0,5$ y $10,8 \text{ mg kg}^{-1}$, registrándose los valores medios máximos en los puntos AZ-1 y VZ-7.

Zn

Figura 36: Distribución porcentual media de Zn en sedimento (Las recuperaciones obtenidas mediante la suma de concentraciones de cada fracción con respecto a la concentración total fueron mayores del 85%).

Por último, los resultados de la medición de la concentración de Cu en cada una de las etapas de la extracción secuencial son mostrados en la Figura 37. En ella se vuelve a apreciar que al igual que ocurre con el resto de los metales analizados, el cobre también se encuentra asociado principalmente a los óxidos de Fe y Mn con porcentajes que varían entre 60 y el 76%, seguido del residuo final, cuya proporción oscila entre el 13 y 27%. Las fracciones más disponibles son en este caso las que adquieren mayores niveles de porcentaje

con respecto al total en comparación con los otros metales, comprendiendo entre el 2,6 y 13,3% del Cu total presente en los sedimentos, pudiendo este hecho estar favorecido por el efecto de la agricultura y la aplicación de fertilizantes ricos en Cu. Si bien, pese a que esta proporción es algo superior, en valores absolutos, las concentraciones son bajas oscilando entre 0,9 y 4,1 mg kg⁻¹.

Figura 37: Distribución porcentual media de Cu en sedimento (Las recuperaciones obtenidas mediante la suma de concentraciones de cada fracción con respecto a la concentración total fueron mayores del 85%).

3.1.2. Acumulación de metales pesados en *Typha domingensis*

— Mercurio (Hg)

Los valores de concentración de Hg en hoja que pueden ser considerados como “normales” para macrófitas que crecen en áreas no contaminadas por Hg oscilan entre 0,006 y 0,019 mg kg⁻¹ (Moore et al., 1995). Comparando dicho valor con el obtenido en las hojas pertenecientes a las muestras ubicadas en el punto control VZ-0, se observa que estas últimas poseen concentraciones ligeramente superiores, con valores comprendidos entre 0,07 y 0,19 mg kg⁻¹. Este hecho aporta indicios, al igual que sucedía con los sedimentos pertenecientes a dicha área, del impacto que la minera ha ejercido sobre la zona.

Mientras, la Figura 38 muestra los intervalos de concentración de mercurio obtenidos durante los tres años de muestreo para cada una de las fracciones de *T. domingensis* correspondientes a los puntos de muestreo distintos de VZ-0, y que por tanto se ubican dentro del distrito minero. Los rangos de concentración entre los que oscilan cada uno de los órganos analizados son los siguientes: hojas (0,04 - 1,00 mg kg⁻¹), núcleo radicular (0,12 - 8,7 mg kg⁻¹), rizoma (0,07 - 5,5 mg kg⁻¹) y raíz (0,44 - 19,0 mg kg⁻¹).

Figura 38: Diagrama de cajas y bigotes de concentración de Hg en las diferentes fracciones de *T. domingensis* detallando valores inferiores a 25 mg kg⁻¹

Si bien, cabe destacar que en estos rangos no han sido incluidos los valores máximos registrados en los puntos AZ-1 y VZ-6 en el año 2011, donde se han llegado a alcanzar concentraciones de 30 ± 6 y 23 ± 1 mg kg⁻¹ en los núcleos radiculares y de 88 ± 10 y 94 ± 10 mg kg⁻¹ en las raíces para cada uno de los puntos respectivamente.

A través de la Figura 39, se puede observar la variación de la concentración de Hg en cada fracción a lo largo del río. En ellas se aprecia que las máximas concentraciones de Hg en cada uno de los órganos de *T. domingensis* se localizan en los puntos AZ-1 y VZ-6, llegando a ser en el caso de las hojas entre 2 y 10 veces mayores a los registrados en VZ-0. Mientras que en las raíces, la diferencia con las hojas es entre 12 y 270 veces superior a ésta. Este hecho coincide con aquellos puntos de muestreo donde también se midieron las concentraciones más altas en sedimento.

Figura 39: Valores medios de concentración de Hg obtenidos durante los tres años de estudio en las diferentes fracciones de *T. domingensis* en cada uno de los puntos de muestreo

Comparando las concentraciones de Hg registradas en la parte aérea con el umbral de toxicidad propuesto por Kabata-Pendias (2011) en hojas maduras para una diversidad de especies vegetales ($1-3 \text{ mg kg}^{-1}$), se observa que estas concentraciones ni superan y ni están incluidas dentro de dicho umbral.

Además, el estudio estadístico entre las diferentes fracciones de la planta, (sin tener en cuenta VZ-0), confirma que las hojas acumulan una menor cantidad de Hg en comparación con el resto de fracciones que conforman *T. domingensis* (Tabla 16 – Criterio 1). Mientras tanto, en los tejidos pertenecientes a la parte subterránea, sólo la acumulación de Hg en las raíces y los rizomas mostraron diferencias estadísticamente significativas entre ellos, estando de esta forma el núcleo radicular en un punto intermedio entre ambas.

Sin embargo, si se realiza un nuevo análisis estadístico (Tabla 16 – Criterio 2) en el que no se incluyen los datos correspondientes a los puntos AZ-1 y VZ-6 del año 2011 al ser considerarlos como discrepantes, se observa que, al igual que en el primer caso, las hojas continúan siendo los órganos donde se registra la menor concentración de mercurio, pero además, se determina que la acumulación de Hg en las raíces es estadísticamente diferente al resto de fracciones, siendo por tanto el órgano donde se lleva a cabo la mayor acumulación de dicho metal. De esta forma, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos, el patrón de acumulación de Hg de las muestras recogidas puede resumirse de la siguiente manera: raíz > núcleo radicular = rizoma > hoja.

Tabla 16: Diferencias en la concentración de Hg entre diferentes órganos analizados de *T. domingensis*

Hojas (HJ), núcleo radicular (NR), rizoma (RM), raíz (RZ)						
Criterio	HJ-NR	HJ-RM	HJ-RZ	NR-RM	NR-RZ	RM-RZ
1	0,000*	0,002*	0,000*	0,378	0,011	0,001*
2	0,000*	0,003*	0,000*	0,496	0,004*	0,001*

Las diferencias fueron calculadas utilizando test de Mann-Whitney. El nivel de significación fue calculado de acuerdo con la siguiente expresión: $0,05/k$, donde k es el número de combinaciones diferentes entre los tejidos de un grupo.

* Diferencias significativas entre los órganos de la planta $\rightarrow \alpha = 0,05/6 = 0,008$

— Plomo

Las hojas de *T. domingensis* en el punto control, mostraron concentraciones de plomo por debajo del límite de detección. Resultado similar se obtuvo en el resto de los puntos de muestreo donde la concentración en hoja no pudo ser cuantificada ya que éstas se situaban por debajo de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ que es el límite de detección del equipo, el cual equivale aproximadamente a una concentración de 5 mg kg^{-1} en muestra sólida seca, y por tanto se encuentran muy alejadas del límite de toxicidad comprendido entre 30 y 300 mg kg^{-1} (Massa et al., 2010).

Figura 40: Diagrama de cajas y bigotes de acumulación de Pb en las diferentes fracciones de *T. domingensis*

En cambio, la concentración de plomo en las otras tres fracciones en las que se dividió *T. domingensis* si pudo ser cuantificada en la mayoría de las muestras, siendo los rangos de concentración para cada una de ellas los siguientes: núcleo radicular ($6,8 - 22,3 \text{ mg kg}^{-1}$), rizoma ($4,6 - 68,2 \text{ mg kg}^{-1}$) y raíz ($14,6 - 155,2 \text{ mg kg}^{-1}$).

Gracias a los gráficos de la Figura 41, se puede conocer dónde se registran los máximos y mínimos de concentración en planta. Así, se puede apreciar que la concentración de Pb en general va aumentando a medida que se sigue el flujo del río, alcanzándose los valores más elevados en el punto VZ-7, al igual que ocurría con la concentración total en sedimento.

Figura 41: Valores medios de concentración de Pb obtenidos durante los tres años de estudio en las diferentes fracciones de *T. domingensis* en cada uno de los puntos de muestreo

Para conocer la existencia de diferencias en la acumulación entre las distintas fracciones, se llevó a cabo el test Mann-Whitney, cuyos resultados son expuestos en la Tabla 17. En ella, se puede observar que el núcleo radicular no muestra diferencias significativas con el rizoma, y que es la raíz, el órgano que posee un comportamiento distinto en comparación con las otras dos fracciones anteriormente citadas.

De esta forma, el orden de acumulación de Pb en las muestras analizadas de *T. domingensis* es el siguiente: raíz > núcleo radicular = rizoma > hoja.

Tabla 17: Diferencias en la concentración de Pb entre diferentes órganos analizados de *T. domingensis*

Hojas (HJ), núcleo radicular (NR), rizoma (RM), raíz (RZ)					
HJ-NR	HJ-RM	HJ-RZ	NR-RM	NR-RZ	RM-RZ
0,000*	0,000*	0,000*	0,908	0,000*	0,001*

Las diferencias fueron calculadas utilizando test de Mann-Whitney. El nivel de significación fue calculado de acuerdo con la siguiente expresión: $0,05/k$, donde k es el número de combinaciones diferentes entre los tejidos de un grupo.

* Diferencias significativas entre los órganos de la planta $\rightarrow \alpha = 0,05/6 = 0,008$

— Cinc

Las concentraciones de Zn de cada fracción en VZ-0 varían entre un año y otro, aunque los valores registrados en las hojas son en todos los casos inferiores a la concentración media de Zn (60 mg kg^{-1}) para plantas creciendo en lugares denominados como “normales” o que no han sido afectados por este metal (Alloway, 2013).

Mientras, los rangos de concentración de Zn para cada una de las fracciones en el resto de los puntos de muestreo son expuestos en la Figura 42. En dicho gráfico, se puede apreciar que las hojas son los órganos que presentan un menor intervalo de concentración, oscilando entre $8,5$ y $28,9 \text{ mg kg}^{-1}$. Estos valores se encuentran bastante alejados del umbral de toxicidad expuesto por Kabata-Pendias (2011), el cual se ubica entre 100 y 400 mg kg^{-1} . Seguido a las hojas, se sitúan los rizomas, con valores de concentración comprendidos entre $13 - 80 \text{ mg kg}^{-1}$, quedando en último lugar, las raíces y los núcleos radiculares, en cuyas fracciones se registran los mayores rangos de concentraciones de Zn, con valores comprendidos entre $15 - 127 \text{ mg kg}^{-1}$ y $11 - 152 \text{ mg kg}^{-1}$ respectivamente.

Figura 42: Diagrama de cajas y bigotes de acumulación de Zn en las diferentes fracciones de *T. domingensis*.

Atendiendo a los gráficos de la Figura 43, se observa que la concentración de Zn en la mayoría de los órganos adquiere un comportamiento creciente a medida que se avanza a lo largo del río, encontrándose los máximos valores en el punto VZ-7, el cual, al igual ocurriría con el plomo, coincide con ser el lugar donde también se obtuvieron las concentraciones más altas de este metal en sedimento, influenciado por su cercanía a la mina de Nuestra Señora de la Encarnación.

Figura 43: Valores medios de concentración de Zn obtenidos durante los tres años de estudio en las diferentes fracciones de *T. domingensis* en cada uno de los puntos de muestreo

En la Tabla 18 se muestran los resultados obtenidos a través del estudio estadístico donde se han comparado las concentraciones de Zn en los diferentes tejidos de *T. domingensis*. En dichos resultados se observa que la acumulación de Zn en cada una de las fracciones de la planta es distinta entre sí, a excepción de la realizada por las raíces y los núcleos radiculares, donde no se encontraron diferencias significativas entre ambas partes, siendo por tanto, el patrón de acumulación de Zn el expuesto a continuación: raíz = núcleo radicular > rizoma > hoja.

Tabla 18: Diferencias en la concentración de Zn entre diferentes órganos analizados de *T. domingensis*

Hojas (HJ), núcleo radicular (NR), rizoma (RM), raíz (RZ)					
HJ-NR	HJ-RM	HJ-RZ	NR-RM	NR-RZ	RM-RZ
0,000*	0,001*	0,000*	0,001*	0,324	0,002*

Las diferencias fueron calculadas utilizando test de Mann-Whitney. El nivel de significación fue calculado de acuerdo con la siguiente expresión: $0,05/k$, donde k es el número de combinaciones diferentes entre los tejidos de un grupo.

* Diferencias significativas entre los órganos de la planta $\rightarrow \alpha = 0,05/6 = 0,008$

— Cobre

La concentración media de cobre en hojas maduras creciendo en un área no contaminada es de $7,9 \text{ mg kg}^{-1}$ (Oustridge y Noller, 1991). Esta concentración es algo superior a la registrada en VZ-0 donde los valores se hallan entre $3,6$ y $5,1 \text{ mg kg}^{-1}$. En las muestras pertenecientes a los puntos de muestreo localizados dentro del distrito de Almadén, la concentración de Cu en parte aérea no muestra una gran variación con respecto al punto control, oscilando entre $2,8$ y $10,4 \text{ mg kg}^{-1}$ y con valor medio de $5,03 \pm 1,93 \text{ mg kg}^{-1}$. Dichos valores se encuentran dentro del rango expuesto por Oorts (2013) para plantas que crecen en zonas no contaminadas ($4 - 15 \text{ mg kg}^{-1}$), por lo que puede suponerse a priori que la influencia de este metal sobre la vegetación de ribera es muy baja.

En lo referido al resto de órganos, los rangos de concentración registrados a lo largo del distrito minero fueron los siguientes: $3,3 - 22,6 \text{ mg kg}^{-1}$ en núcleos radiculares, $1,2 - 14,4 \text{ mg kg}^{-1}$ en rizomas y $2,9 - 30 \text{ mg kg}^{-1}$ en raíces. En el caso de la raíz, sus valores se situaban muy por debajo de la concentración crítica de Cu para raíces situada entre 100 y 400 mg kg^{-1} (Oorts, 2013).

Figura 44: Diagrama de cajas y bigotes de acumulación de Cu en las diferentes fracciones de *T. domingensis*.

Si se examina la evolución de la concentración de Cu en cada una de las fracciones a lo largo del río (Figura 45), no se llega a apreciar de forma totalmente clara un patrón común en todos los órganos, si bien, existe cierta tendencia que muestra la existencia de una mayor acumulación de Cu en los puntos VZ-2 y AZ-1.

Figura 45: Valores medios de concentración de Cu obtenidos durante los tres años de estudio en las diferentes fracciones de *T. domingensis* en cada uno de los puntos de muestreo

La Tabla 19 muestra los resultados estadísticos obtenidos en la comparativa de acumulación entre las distintas fracciones. En ella se observan diferencias estadísticamente significativas en la acumulación de Cu entre todas las fracciones de *T. domingensis* a excepción de la comparación llevada a cabo entre la hoja y el rizoma, haciendo que de esta manera, el orden de acumulación de Cu quede resumido de la siguiente forma: raíz > núcleo radicular > rizoma = hoja.

Tabla 19: Diferencias en la concentración de Cu entre diferentes órganos analizados de *T. domingensis*

Hojas (HJ), núcleo radicular (NR), rizoma (RM), raíz (RZ)					
HJ-NR	HJ-RM	HJ-RZ	NR-RM	NR-RZ	RM-RZ
0,000*	0,213	0,000*	0,008*	0,010**	0,000*

Las diferencias fueron calculadas utilizando test de Mann-Whitney con la excepción de NR-RZ donde se llevó a cabo el test de Welch. El nivel de significación en el test no paramétrico fue calculado de acuerdo con la siguiente expresión: $0,05/k$, donde k es el número de combinaciones diferentes entre los tejidos de un grupo.

* Diferencias significativas entre los órganos de la planta $\rightarrow \alpha = 0,05/5 = 0,01$

** Diferencias significativas entre NR-RZ $\rightarrow \alpha = 0,05$

3.1.2.1. Comparativa de niveles de concentración en estudios anteriores del género *Typha*

La realización de una comparativa acerca de los resultados obtenidos en diversos trabajos sobre la acumulación de metales pesados en una o varias especies de un mismo género de planta, puede ser complicada e incluso sesgada. Sobre todo si, la concentración de los metales en el medio en el que han crecido dichas especies no ha sido el mismo, o al menos similar entre ellos, siendo la concentración de metal disponible uno de los factores más determinantes.

En las Tablas 21 – 24 se muestran algunos de los estudios llevados a cabo sobre la acumulación de Hg, Pb, Zn y Cu en plantas del género *Typha*. Como se puede apreciar, los rangos de concentración encontrados en otros trabajos pueden llegar a ser muy amplios y diferentes entre ellos. De este modo, sólo en algunos de los estudios donde la concentración de metal disponible en el medio es bastante similar a los obtenidos en la Comarca de Almadén, se observó que los valores medios en hoja y raíz tienden a ser similares a los valores medios obtenidos en el presente trabajo, sobre todo en aquellos casos donde la planta ha crecido en un entorno natural, ya que, cuando ésta lo hace en humedales artificiales suele haber un ligero incremento en la acumulación. Este hecho puede deberse a las condiciones favorables que aporta un humedal artificial a las plantas como es la existencia de un régimen hídrico más constante, favoreciendo el correcto desarrollo de la planta (Murphy y Cooper, 2010).

Tabla 20: Intervalos de concentración de Hg observados en bibliografía con especies del género *Typha*

Hg						
Especie	Medio	Concentración total en el medio (mg kg ⁻¹)	Concentración disponible en el medio (mg kg ⁻¹)	Concentración en hoja (mg kg ⁻¹)	Concentración en raíz (mg kg ⁻¹)	Referencia
<i>Typha latifolia</i>	Solución en arena	-	4	0,18	13,98	Willis et al. (2010)
<i>Typha latifolia</i>	Humedal artificial	6,35	0,05	2,5	6,5	Anning et al. (2013)
<i>Typha latifolia</i>	Sedimento lago	0,25 – 0,54	-	0,31 – 0,50	-	Szymanowska et al. (1999)
<i>Typha domingensis</i>	Humedal artificial	-	9	273,4	-	Teles et al. (2014)
<i>Typha domingensis</i>	Sedimento río	2,60 – 724	0,01 – 0,17	0,04 – 1,01	0,44 – 94,32	Presente estudio

Tabla 21: Intervalos de concentración de Pb observados en bibliografía con especies del género *Typha*

Pb						
Especie	Medio	Concentración total en el medio (mg kg ⁻¹)	Concentración disponible en el medio (mg kg ⁻¹)	Concentración en hoja (mg kg ⁻¹)	Concentración en raíz (mg kg ⁻¹)	Referencia
<i>Typha latifolia</i>	Sedimento arroyo	10	-	8	13	Sasmaz et al. (2008)
<i>Typha latifolia</i>	Sedimento estanque	3,15 – 19,9	-	1,65 – 4,13	4,70 – 20,7	Klink et al. (2013)
<i>Typha latifolia</i>	Sedimento lago	22,8 – 55,2	-	9 – 17,5	10 – 25	Carranza-Álvarez et al. (2008)
<i>Typha latifolia</i>	Sedimento	26 - 18894	5,6 - 1558	19 – 40	25 - 3628	Ye et al. (1997)
<i>Typha latifolia</i>	Humedal artificial	1,75	0,19	3,8	5	Anning et al. (2013)
<i>Typha latifolia</i>	Sedimento lago	9,7 – 13,4	0,06 – 0,08	6,9 – 19,3	-	Szymanowska et al. (1999)
<i>Typha domingensis</i>	Sedimento río	30 – 62,5	0,004 – 0,019	12,5	10	Fawzy et al. (2012)
<i>Typha domingensis</i>	Sedimento arroyo	12,9 – 77,2	-	1,57 – 4,53	21,1 – 201,6	Cardwell et al. (2002)
<i>Typha domingensis</i>	Sedimento río	20 - 241	-	-	14,6 - 155	Presente estudio

Tabla 22: Intervalos de concentración de Zn observados en bibliografía con especies del género *Typha*

Zn						
Especie	Medio	Concentración total en el medio (mg kg ⁻¹)	Concentración disponible en el medio (mg kg ⁻¹)	Concentración en hoja (mg kg ⁻¹)	Concentración en raíz (mg kg ⁻¹)	Referencia
<i>Typha latifolia</i>	Sedimento arroyo	70	-	215	340	Sasmaz et al. (2008)
<i>Typha latifolia</i>	Sedimento estanque	10,3 - 214	-	19,8 – 28,3	107 - 935	Klink et al. (2013)
<i>Typha latifolia</i>	Sedimento	86 - 3009	7,4 - 229	22 - 122	46 - 946	Ye et al. (1997)
<i>Typha latifolia</i>	Humedal artificial	6,65	0,42	30	35	Anning et al. (2013)
<i>Typha domingensis</i>	Sedimento río	85 - 180	0,0015 – 0,12	30	60	Fawzy et al. (2012)
<i>Typha domingensis</i>	Humedal artificial	65 - 77	< 0,025	61	392	Hadad et al. (2010)
<i>Typha domingensis</i>	Sedimento arroyo	93 – 514	-	21,4 – 83,4	355,5 - 1030	Cardwell et al. (2002)
<i>Typha domingensis</i>	Sedimento río	53,1 - 566	0,55 – 10,81	8,5 – 28,9	15 - 122	Presente estudio

Capítulo III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 23: Intervalos de concentración de Cu observados en bibliografía con especies del género *Typha*

Cu						
Especie	Medio	Concentración total (mg kg ⁻¹)	Concentración disponible (mg kg ⁻¹)	Concentración en hoja (mg kg ⁻¹)	Concentración en raíz (mg kg ⁻¹)	Referencia
<i>Typha latifolia</i>	Sedimento arroyo	45	-	30	50	Sasmaz et al. (2008)
<i>Typha latifolia</i>	Sedimento estanque	2,05 – 8,85	-	1,31 – 4,76	4,72 – 12,4	Klink et al. (2013)
<i>Typha latifolia</i>	Humedal artificial	34,5	0,31	34,9 – 65,1	30,22 – 32,7	Anning et al. (2013)
<i>Typha latifolia</i>	Sedimento lago	2,05 – 2,95	0,004 – 0,006	2,05 – 3,60	-	Szymanowska et al. (1999)
<i>Typha domingensis</i>	Sedimento río	40 – 93	0,008 – 0,025	9	25	Fawzy et al. (2012)
<i>Typha domingensis</i>	Sedimento arroyo	17,6 – 38,3	-	3,37 – 14,9	53,5 – 127,4	Cardwell et al. (2002)
<i>Typha domingensis</i>	Sedimento río	14,9 – 47,7	0,88 – 4,14	2,8 – 10,4	2,9 – 30	Presente estudio

3.1.2.2. Comparativa de perfiles de acumulación

En la mayoría de los estudios acerca de la acumulación de metales pesados en plantas del género *Typha*, se observa que la distribución de muchos metales pesados como Pb, Cu o Zn suelen seguir la distribución raíz > rizoma > hoja (Klink et al., 2013; Ellis et al., 1994; Pandey et al., 2014; Dunbabin y Bowmer, 1992; Mays y Edwards 2001). Este patrón también es frecuentemente encontrado en otras macrófitas emergentes como *Phalaris arundinacea*, *Scirpus maritimus* o *Phragmites australis* (Ebrahimi et al., 2011; Vymazal et al., 2007). Sin embargo, aunque dicha distribución es la más común, existen otros trabajos como el desarrollado por Cardwell et al. (2002) con Pb, Cu y Zn y la especie *Typha domingensis* donde los resultados obtenidos por dicho autor apoyaban el patrón raíz > rizoma > hoja en el caso del Pb, pero no para el Cu y Zn, ya que con ellos no se encontraban diferencias significativas entre rizoma y hoja. La explicación que aportaba este autor era que las plantas muestran una mayor facilidad de transporte para aquellos elementos que poseen funciones biológicas.

Tabla 24: Patrones de acumulación de Hg, Pb, Zn y Cu en *T. domingensis*

Metal	Distribución
Mercurio	Raíz > núcleo radicular = rizoma > hoja
Plomo	Raíz > núcleo radicular = rizoma > hoja
Cinc	Raíz = núcleo radicular > rizoma > hoja
Cobre	Raíz > núcleo radicular > rizoma = hoja

Atendiendo a la Tabla 24, el patrón de acumulación de Hg, Pb, Cu y Zn mostrado por *T. domingensis* en el presente estudio es diferente dependiendo del tipo de metal. Aunque en todos los casos, la raíz es el órgano donde se encuentran las mayores concentraciones de metal, mientras que las hojas se sitúan en la posición opuesta. De esta forma, es la acumulación presente en el rizoma y en el núcleo radicular la que marca la diferencia en los patrones de cada metal.

Un aspecto a destacar es que, con la introducción de la fracción “núcleo radicular” en el presente trabajo, se esperaba que el patrón de acumulación fuese de la siguiente forma: raíz > núcleo > rizoma > hoja. El porqué de este supuesto es debido a que el núcleo radicular es la fracción del rizoma donde se produce una mayor intersección con las raíces y por tanto, se estima que una vez absorbidos los metales a través de éstas, el siguiente órgano que mostraría una mayor concentración sería el núcleo y corroboraría por tanto,

la hipótesis de que dicha zona podría actuar como última barrera para evitar la migración de los metales al resto del rizoma o su translocación a la hoja, especialmente para aquellos elementos que no poseen función biológica.

Sin embargo, si se compara dicha hipótesis con los patrones obtenidos, se observa que salvo el cobre, el resto no cumplen con la hipótesis anterior, pues en el caso del mercurio y plomo, el núcleo radicular no muestra diferencia estadísticamente significativa con el rizoma, mientras que con el cinc la semejanza ocurre entre dicha fracción y la raíz.

Para poder extrapolar los resultados obtenidos con los expuestos por otros autores, se eliminó la fracción núcleo radicular de los patrones de acumulación, quedando resumidos en la Tabla 25.

Tabla 25: Patrones de acumulación de Hg, Pb, Zn y Cu en *T. domingensis* excluyendo el núcleo radicular

Metal	Patrón de acumulación
Mercurio	Raíz > rizoma > hoja
Plomo	Raíz > rizoma > hoja
Cinc	Raíz > rizoma > hoja
Cobre	Raíz > rizoma = hoja

Así, al tener en cuenta sólo estas tres fracciones se puede ver que las distribuciones de los metales en las muestras de *T. domingensis* analizadas, siguen un patrón similar a los expuestos en la mayoría de los trabajos relativos a la especie *Typha* y otras macrófitas acuáticas con la única excepción del cobre, donde la ausencia de diferencias entre el rizoma y la hoja se asemeja al resultado obtenido por Cardwell et al. (2002).

3.2. Eficiencia de la acumulación de metales pesados en *Typha domingensis*

Para comprender más a fondo los resultados obtenidos de *T. domingensis* y sus posibles aplicaciones en fitotecnología, la finalidad del presente apartado va a consistir en evaluar el comportamiento y eficiencia de absorción y acumulación de *T. domingensis* para de este modo poder conocer sus posibilidades en fitotecnología. Para ello se utilizarán los siguientes indicadores:

- Factor de translocación (TF)
- Umbral de hiperacumulación
- Factor de bioacumulación (BAF)
- Cantidad de extracción (Biomasa)

3.2.1. Factor de translocación

El ratio que existe entre la concentración de un metal en las hojas y en las raíces es conocido como factor de translocación (TF) y otorga información sobre la capacidad de una planta para movilizar un contaminante desde sus raíces a su parte aérea. Este movimiento depende de diversos factores como la especie de planta, el tipo de metal e incluso, de los factores ambientales, como son el pH, Eh, temperatura, salinidad, contenido en materia orgánica, nutrientes o la presencia de otros metales (Greger, 1999; Fritioff et al., 2005; Yang y Ye, 2009).

De acuerdo con la distribución de los metales y su relación con el medio, Baker (1981) clasificó las plantas en acumuladoras, indicadoras y exclusoras. En el caso de las primeras, éstas concentran el elemento de interés en su parte aérea, mostrando una relación raíz/hoja (TF) mayor de 1. En cambio, las exclusoras mantienen la concentración del metal en hoja a niveles bajos, siendo mayor en las raíces y por tanto poseen un TF inferior a 1. De este modo, para la aplicación de tecnologías de fitoextracción, las plantas a utilizar deberían de tener una estrategia acumuladora, mientras que, si lo que se pretende es llevar a cabo técnicas de fitoestabilización, la especie escogida ha de mostrar un comportamiento exclusor. Por último, las plantas indicadoras son aquellas cuya concentración en sus tejidos muestran una relación significativa con los niveles del entorno, aunque este aspecto se desarrollará más exhaustivamente en el apartado 3.3.

En la Tabla 26 se muestra los rangos de translocación de cada uno de los metales en los diferentes puntos de muestreo. Como se pudo observar en el apartado 3.1.2., las mayores concentraciones de metal en la planta se registraban en las raíces para cada uno de los elementos, y por ello, era de esperar que la mayoría de los valores de TF (aproximadamente el 96% de las muestras analizadas) fuesen menores de 1. Resultados similares fueron obtenidos en *T. domingensis* y otras plantas del género *Typha* en los trabajos llevados a cabo por Hadad et al. (2010), Hegazy et al. (2011), Pandey et al. (2014) y Sasmaz et al. (2008), siendo observados no sólo en lo relativo al Hg, Zn, Cu y Pb sino también con otros metales como Fe, Al, Cd o Cr. Un detalle que puede resultar de interés, son los factores de translocación obtenidos en el punto VZ-0, los cuales llegan a ser más altos que en la mayoría de las otras zonas de estudio. Si bien, este hecho no es debido a que efectivamente se haya realizado una mayor translocación de metal, sino que al haberse realizado una menor acumulación en la raíz, el cociente entre esta fracción y la hoja es mayor.

$$\text{Factor de translocación} = \text{TF} = \frac{[\text{Metal}]_{\text{Hoja}}}{[\text{Metal}]_{\text{Raíz}}}$$

Tabla 26: Factores de translocación de Hg, Zn y Cu en cada punto de muestreo

Punto de muestreo	Metal		
	Hg	Zn	Cu
VZ-0	0,27 – 0,34	0,16 – 1,34	0,26 – 0,46
VZ-1	0,03	0,42	0,36
VZ-2	0,03 – 0,07	0,26 – 0,36	0,19 – 0,58
VZ-3	0,08	0,28	0,55
VZ-4	0,16 – 0,33	0,24 – 0,55	0,21 – 0,36
VZ-5	0,02 – 0,11	0,26 – 0,41	0,30 – 0,49
AZ-1	0,01 – 0,03	0,13 – 0,48	0,15 – 0,44
VZ-6	0,01 – 0,05	0,19 – 1,01	0,14 – 0,84
VZ-7	0,04 – 0,05	0,12 – 0,41	0,20 – 0,70
VZ-8	0,02 – 0,04	0,36 – 0,40	0,24 – 1,45

*Los valores de translocación de Pb han sido omitidos debido a que la concentración en hoja fue en todos los casos <LD, haciendo que dicho factor fuese siempre <1.

Por último, existe otro aspecto a destacar a partir de los valores de TF calculados en el presente estudio y es el hecho de que los factores de Hg y Pb son en general, menores que los de Zn y Cu. Esta circunstancia puede atribuirse a que, como el mercurio y el plomo no poseen ninguna función biológica, la planta tiende a secuestrar estos metales en su parte radicular para intentar de esta manera aliviar sus potenciales efectos tóxicos (Marchand et al., 2010), a diferencia del cobre y el cinc, cuyas propiedades como micronutrientes hacen que se promueva su transporte a lo largo de la planta y de ahí que exista una menor diferencia de la concentración en hoja de estos elementos con respecto a la raíz (Yang y Ye, 2009). Resultados similares pudieron verse en el trabajo desarrollado por Mazej y Germ (2009) donde dos macrófitas flotantes (*Nuphar lutea* y *Potamogeton nodosus*) y dos sumergidas (*Najas marina*, *Potamogeton lucens*) mostraron TF mucho más pequeños para Pb y As que para Cu y Zn, estando los factores de estos últimos muy próximos a 1 o incluso llegándolos a superar.

3.2.2. Factor de bioacumulación (BAF)

El factor de bioacumulación o comúnmente conocido por sus siglas en inglés BAF (Bioaccumulation factor) o BCF (Bioconcentration factor), es la relación existente entre la concentración de metal en una fracción de la planta y la concentración de metal en el suelo (Yoon et al., 2006). Dicho factor suele ser utilizado para conocer la eficiencia de una planta para absorber y acumular un metal en sus tejidos, existiendo diversos criterios para calcularlo. Así, el método más utilizado se basa en el uso de las concentraciones totales de un metal en un suelo o sedimento y en el órgano de interés, sin tener en

cuenta para ello la biodisponibilidad de ese metal en el medio (EPA, 2007). Sin embargo, este hecho puede provocar una infraestimación de la capacidad de la planta por acumular metales ya que, como se ha visto en el apartado 3.1.1.3, no toda la concentración del metal en el medio se encuentra disponible para la planta. Es por este motivo que en el presente estudio se decidió calcular los BAF utilizando la concentración de metal disponible en vez del total, quedando de esta manera expuestos en la Tabla 27 los BAF calculados para hoja y raíz, en cada uno de los puntos de muestreo y para cada uno de los elementos analizados.

$$\text{Factor de bioacumulación} = \text{BAF} = \frac{[\text{Metal}]_{\text{Fracción planta}}}{[\text{Metal}]_{\text{Disponible sedimento}}}$$

A la vista de los resultados, se observa que los valores de BAF tanto para hoja como para raíz son superiores a 1 en la gran mayoría de los casos, lo que confirma la existencia de un flujo positivo de metales desde el sedimento hacia la planta. Los metales que registran factores más elevados son el mercurio y cinc en las raíces, aunque los BAF en hoja de este último metal también llegan a alcanzar valores destacables, pues, como se ha mencionado anteriormente el cinc posee un rol importante en las funciones biológicas de la planta.

El alto rendimiento mostrado por *T. domingensis* para acumular metales pesados en sus tejidos aun siendo baja la disponibilidad de los mismos en el medio, coincide con los resultados obtenidos en otros trabajos llevados a cabo con dicha especie (u otras del mismo género) y en diversas condiciones (Tablas 21 - 24). De la bibliografía consultada, sólo en aquellos casos donde la concentración de metal disponible era muy elevada, los Factores de Bioacumulación en hoja fueron menores de 1. Ejemplo de ello puede verse en el estudio desarrollado por Ye et al. (1997) donde individuos del *T. latifolia* que crecían en un entorno con una concentración disponible aproximada de 1.000 mg kg⁻¹ de Pb y 229 mg kg⁻¹ de Zn, su acumulación en hoja alcanzaba 40 mg kg⁻¹ y 122 mg kg⁻¹ respectivamente, siendo por tanto sus BAF inferiores a 1 en ambos casos. En cambio, esto no ocurre con las raíces, donde en todos los casos la concentración que alcanzaron fue superior a la disponible, haciendo que sus BAF sigan siendo mayores de 1, lo que demuestra que la mayor acumulación se realiza en esos órganos.

Tabla 27: Rango de factores de bioacumulación de Hg, Pb, Zn y Cu en hoja y raíz en cada punto de muestreo

Punto de muestreo	BAF						
	Hg		Pb	Zn		Cu	
	Hoja	Raíz	Raíz	Hoja	Raíz	Hoja	Raíz
VZ-0	2,3 – 6,2	10 - 18	4,4 – 5,3	9,0 – 168	125 - 437	3,6 – 5,1	8,6 – 14,6
VZ-1	20,6	761	3,9	0,6	1,4	3,4	9,4
VZ-2	1,7 – 2,7	25 - 93	4,3 – 6,4	3,6 – 8,4	9,9 – 31,9	3,1 – 10,4	16,2 – 17,9
VZ-3	8,8	107	5,0	0,9	3,4	4,6	8,3
VZ-4	2,5 – 7,3	12 - 28	3,1 – 5,2	1,7 – 56,7	7,4 - 100	1,3 – 5,1	3,7 – 22,8
VZ-5	1,1 – 6,8	52 - 63	2,9 – 15,6	7,7 – 46,7	21,6 – 178	3,0 – 4,1	8,4 – 10,2
AZ-1	1,8 – 9,0	55 - 927	6,3 – 9,0	1,2 – 75,7	6,8 - 197	2,8 – 9,0	19,0 – 25,7
VZ-6	1,7 – 7,5	33 - 586	3,5 – 14,9	1,3 – 5,3	4,6 – 7,1	1,4 – 4,7	3,8 – 14,4
VZ-7	1,4 - 13	29 - 292	19,8 – 31,0	1,6 - 110	5,0 - 410	1,6 – 4,5	4,1 – 12,0
VZ-8	0,5 – 4,6	29 - 122	11,5 – 13,8	1,3 – 87,3	3,4 - 215	1,0 – 4,2	0,7 – 17,5

*El cálculo del BAF para plomo en hoja no se llevó a cabo debido a que todos los valores de concentración se situaban por debajo del límite de detección. **En aquellos casos en los que no se dispuso del valor de concentración de metal disponible, fueron aplicados los correspondientes al estudio desarrollado por García-Ordiales (2014a)

3.2.3. Umbral de hiperacumulación

El término de “hiperacumulación” fue empleado por primera vez por Brooks et al. (1977) para describir a aquellas plantas que creciendo sobre suelos serpentiniticos eran capaces de alcanzar concentraciones de

níquel en sus hojas superiores a 1.000 mg kg^{-1} en peso seco. A medida que pasó el tiempo, dicha terminología se fue extendiendo a otros metales. Sin embargo, el umbral a partir del cual una planta llega a ser considerada hiperacumuladora no puede ser establecido por igual para todos los metales ya que tanto su presencia en el medio como sus funciones biológicas pueden ser muy diferentes.

Es por ello, que para la implantación de un umbral de hiperacumulación es necesario establecer un criterio que permita adaptarlo a cada tipo de metal. Así, Van der Ent et al. (2012) propuso que estos límites deberían de cumplir los siguientes requisitos: (i) ser 2 o 3 órdenes de magnitud superiores a las concentraciones normales en hojas de plantas que crecen en suelos “normales” y (ii) ser al menos un orden de magnitud mayor que el rango usual en hojas de suelos metalíferos. De este modo, y aplicando los principios anteriormente expuestos, los umbrales de hiperacumulación para los metales de estudio quedarían resumidos en la Tabla 28:

Tabla 28: Valores umbrales de hiperacumulación de Hg, Pb, Zn y Cu en plantas

Metal	Valores umbrales de hiperacumulación (mg kg^{-1})	Rango de concentraciones en hoja del presente trabajo (mg kg^{-1})
Mercurio	10	0,04 – 1,01
Plomo	1.000	< LD
Cinc	3.000	8,5 – 28,9
Cobre	300	2,8 – 10,4

Fuente: Lasat (2000), Van der Ent et al. (2012)

Si bien, Van der Ent et al. (2012) reconoce que no hay que tomar estos valores como una “barrera absoluta”, donde si una planta no alcanza a superarlos, ésta ha de ser directamente descartada. Sino que, es importante que también sean evaluados otros aspectos, como que el factor de bioacumulación (BAF) y el de translocación (TF) sean mayor de 1 y que la planta muestre hipertolerancia al metal como resultado de una efectiva capacidad de desintoxicación (Baker y Whiting, 2002).

Con respecto al presente trabajo, si se comparan las concentraciones en hoja de las muestras analizadas de *T. domingensis* con los límites expuestos en la Tabla 28, se puede apreciar que en ningún caso éstas superan dichos umbrales, e incluso se encuentran bastante alejadas de los mismos. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros trabajos llevados a cabo (Tablas 21 - 24) con *Typha domingensis* y otras especies del género *Typha* creciendo bajo diferentes concentraciones de metal disponible. Así, sólo en el estudio llevado a cabo por Gomes et al. (2014) y que fue realizado en sistema de lagunaje artificial con una concentración inicial de mercurio disponible de 9 mg kg^{-1} , se pudieron registrar concentraciones superiores al umbral de hiperacumulación, con valores en hoja que llegaron a alcanzar hasta 273 mg kg^{-1} de Hg, lo que supone 27 veces el valor umbral para dicho metal. Si bien, la concentración de mercurio disponible utilizada en ese trabajo es 53 veces superior a la máxima concentración de mercurio disponible obtenida en los sedimentos analizados en la Comarca de Almadén

3.2.4. Cantidad de metal extraído – Estudio de biomasa

Como se ha ido mencionando a lo largo del documento, el principal aspecto de la técnica de fitoextracción es la utilización de plantas que acumulan una concentración significativa de metales pesados en su parte aérea para posteriormente ser recogidas y tratadas.

Así, la mayoría de los estudios llevados a cabo sobre fitorremediación se basan sólo en conocer las concentraciones de metales que llegan a alcanzar los tallos y hojas de una planta. Sin embargo, también es importante conocer cuál es su biomasa y a partir de ella, poder calcular la cantidad de metal que se extrae, permitiendo de este modo evaluar de una forma más exhaustiva su capacidad fitorremediadora y la viabilidad de ser utilizada para tal fin.

Bajo ese planteamiento, se ha querido llevar a cabo en el presente estudio, el desarrollo de un modelo matemático que permita conocer de manera sencilla la biomasa de cualquier individuo de *T. domingensis* a través de la medición in situ de algunos de sus parámetros, donde además no se precisara de la destrucción de dicho individuo para poder obtenerlos. Así, una vez realizada esa medida, se podría hacer un cálculo

aproximado de la cantidad de metal promedio que se extraería si se llevase a cabo la fitoextracción con *T. domingensis* en un área determinada. De este modo, a lo largo de los siguientes apartados, se mostrará el proceso de diseño, desarrollo y aplicación de tal modelo de biomasa.

3.2.4.1. Diseño de muestreo y obtención de datos

Para el desarrollo de dicho estudio se llevó a cabo en el año 2013 un muestreo que consistió en la recolección de diferentes individuos de *T. domingensis* a lo largo de todo el distrito minero de Almadén. Dicho muestreo, se realizó de forma paralela a la campaña anual de 2013. El procedimiento utilizado en el muestreo fue el siguiente:

1. En cada uno de los puntos de muestreo, fueron escogidos diferentes individuos de *T. domingensis* de diverso tamaño a los que se les midió la altura máxima (entendiendo altura máxima como la distancia entre la base y el ápice de la hoja más larga) y el diámetro mayor y menor de su respectiva base, ya que su sección posee una forma aproximadamente elíptica. Además, para asegurar que el modelo que se iba a obtener a raíz de las muestras recogidas fuese lo más representativo posible, se tuvieron en cuenta las siguientes premisas:
  - a. El muestreo se realizaría a lo largo de todo el distrito minero de Almadén y no sólo en una única localización para de este modo poder tener una mayor representatividad de los individuos que crecen en la comarca. Las zonas escogidas fueron por tanto, las mismas donde se realizó el estudio de la acumulación de metales (puntos de VZ-1 a VZ-8 y AZ-1).
  - b. Para asegurar que los individuos que se recogían abarcaban el máximo espectro de alturas, se decidió crear grupos de altura de 15 cm (partiendo desde 0 cm hasta 270 cm) donde se procuró que se cogiesen al menos 3 individuos para cada uno de estos grupos.
2. Una vez medidos dichos parámetros, cada una de las plantas fueron extraídas y guardadas en bolsas de plástico debidamente identificadas, siendo 37 el número total de individuos muestreados.

Una vez llegadas las muestras al laboratorio, se procedió a dividir su parte aérea de la subterránea, anotando a continuación el peso húmedo de cada una de ellas. Posteriormente, se midió la longitud del resto de hojas de todos los individuos. Una vez finalizado dicho paso, las muestras fueron puestas a secar al aire. Y cuando éstas alcanzaron la sequedad, fueron pesadas de nuevo.

Cada uno de los parámetros utilizados puede ser consultado en el Anexo III.

3.2.4.2. Creación del modelo de biomasa

Los parámetros que se han relacionado a través del desarrollo del presente modelo matemático han sido el volumen de la parte aérea y su peso seco. Para ello, la hipótesis de partida se basa en que la forma de la parte aérea de una planta de *T. domingensis* puede asemejarse suficientemente a un cono con base elíptica. Esta hipótesis partió de la simple observación de la planta en los primeros estadios de su desarrollo, antes de abrir sus hojas lateralmente, pues la planta tiene esa forma apuntada que recuerda a un cono. Por tanto, tomando las variables con las que se puede caracterizar y cuantificar el volumen de un cono (altura y diámetro), se consideró que era posible estimar el volumen de la parte aérea de la *Typha*. Clásicamente, técnicas similares de medición se han llevado a cabo en el mundo forestal para cuantificar el volumen de madera que tiene el tronco de un árbol (Diéguez Aranda et al., 2003). Sin embargo, mientras que el transcurso de los años junto con los condicionantes ambientales, tienen gran influencia en el desarrollo longitudinal y diametral de un tronco arbóreo, los órganos aéreos de una *Typha* se desarrollan durante un solo año vegetativo y, por tanto, en ese desarrollo se integra el efecto ecológico que tienen las variables ambientales y de competencia intra e interespecífica, siendo el volumen de la parte aérea de la espadaña menos susceptible a la heterogeneidad morfológica que las que puede desarrollar un árbol. En este sentido, el haber muestreado plantas en zonas de diferente calidad ecológica no debería restar potencial al modelo que aquí se presenta, puesto que esa calidad ecológica se traduce en un crecimiento mayor o menor de la planta, pero difícilmente en una alteración de la relación volumen-biomasa. Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente y, dado que la sección de la base de la parte aérea de una *Typha* no es exactamente circular, sino que se asemeja más a una elipse, se procedió a calcular el volumen de cada uno de los individuos utilizando los parámetros de altura máxima, semieje mayor y menor, aplicando para ello la siguiente fórmula:

Capítulo III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

$$V = \frac{\pi abh}{3}$$

Donde:

- V es el volumen del cono
- a y b son los semiejes de la base
- h es la altura máxima

Una vez obtenidos los volúmenes, se procedió a la creación del modelo. El primer paso fue la representación gráfica en un diagrama de dispersión, en el que se enfrentaba la variable volumen frente el peso seco de la hoja, dando como resultado lo expuesto en la Figura 46.

Figura 46: Diagrama de dispersión volumen y peso seco de hoja

La nube de puntos representada en dicha figura, hace intuir que existe una buena relación lineal entre ambas variables. El siguiente paso, fue conocer si existía evidencia estadística que avalase este supuesto. Para ello se llevó a cabo a través del programa estadístico SPSS una regresión lineal, donde la variable independiente era el volumen de la parte aérea y la variable dependiente el peso seco de la misma. El resultado obtenido es mostrado en las Tablas 30 y 31.

Tabla 29: ANOVA del modelo de regresión simple

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	4467,921	1	4467,921	964,763	0,000a
Residual	162,089	35	4,631		
Total	4630,010	36			

Tabla 30: Coeficientes de regresión

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t.	Sig
	B	Error típ.	Beta		
(Constante)	0,900	0,468		1,925	0,062
Volumen	0,053	0,002	0,982	31,061	0,000

Variable independiente: Volumen

Variable dependiente: Peso

Como se puede apreciar en el análisis de la varianza, el nivel de significación observado es menor de 0,05 por lo que se admite la existencia de una asociación entre ambas variables, la cual queda expresada de la siguiente forma:

$$y = 0,053 x \quad \hat{S}_r = 2,15 \quad R^2 = 0,965$$

Donde:

- Y es el peso seco en gramos (g)
- X es el volumen en centímetros cúbicos (cm³)

Además, el valor del coeficiente de determinación (R^2) es de 0,965, lo que supone que el ajuste del modelo es bastante bueno. Sin embargo, una vez estimado el modelo de regresión, es necesario realizar posteriormente una diagnosis del modelo para comprobar si se cumplen las hipótesis que se han utilizado para construirlo siendo éstas las siguientes:

- **Linealidad:** La relación entre dos variables es lineal.
- **Homocedasticidad:** La variabilidad de las perturbaciones es constante.
- **Normalidad:** Las perturbaciones siguen una distribución normal.
- **Independencia:** Las perturbaciones son independientes entre sí.

La comprobación de estas hipótesis, se realizó a través del análisis de los residuos. Para el caso de la verificación de la linealidad y homocedasticidad, se generó un diagrama de dispersión de residuos tipificados frente a los valores pronosticados tipificados (Figura 47). De esta forma, la hipótesis de igualdad de varianzas de los datos sería aceptable si la anchura vertical del gráfico de dispersión se mantiene razonablemente constante, mientras que la hipótesis de linealidad de los datos se daría por válida si la línea central del gráfico de dispersión es moderadamente recta. Sin embargo, a la vista de los resultados, se puede observar que ninguna de las premisas anteriormente mencionadas se cumple en dicho diagrama.

Por otro lado, para conocer la existencia de normalidad, se creó un gráfico probabilístico normal de residuos (Figura 48) en el cual, para poder aceptar esta hipótesis es necesario que los puntos del gráfico de dispersión estuviesen cerca de la diagonal del cuadrado. Sin embargo, este hecho no se cumple y por lo tanto se entiende que tampoco existe normalidad.

Figuras 47 y 48: (Izq.) Diagrama de dispersión de pronósticos tipificados por residuos tipificados. (Der.) Gráfico de probabilidad normal de los residuos

Capítulo III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En lo relativo a la independencia, se puede considerar que cuando los datos utilizados corresponden al mismo momento temporal (también denominado muestra de corte transversal) es esperable que las perturbaciones sean independientes (Peña, 2002).

De este modo, y dado que no se cumplen tres de las cuatro hipótesis anteriormente expuestas, es necesario llevar a cabo una transformación de las variables que permita validar dicho modelo, siendo el método de máxima verosimilitud el escogido en este caso. En la aplicación de dicho método se utilizan una serie de transformaciones que quedan definidas de la siguiente forma:

$$z(\lambda) = (y^\lambda - 1) / \lambda \bar{y}^{(\lambda-1)} \quad \text{Cuando } \lambda \neq 0$$

$$z(\lambda) = \bar{y} \ln y \quad \text{Cuando } \lambda = 0$$

Donde:

- $\bar{y}$ es la media geométrica de los datos.

Así, el procedimiento a seguir es el siguiente: Sea λ_1 el parámetro para la variable explicativa y λ_2 para la variable explicativa x , se fija un valor de λ_2 y se realizan regresiones entre $x(\lambda_2)$ e $y(\lambda_1)$ para distintos valores de λ_1 hasta determinar el valor de λ_1 que proporciona la regresión de menor varianza residual $\hat{S}_R$ (Peña, 2002).

De esta forma, se procedió en primer lugar, a calcular el error estándar de la regresión que resulta al enfrentar la variable x y la variable $Z(\lambda)$, quedando dichos errores expuestos en la Tabla 31:

Tabla 31: Valores de varianza residual. Variable explicativa x

λ	-2	-1,5	-1	-0,5	0	+0,5	+1	+1,5	+2
$\hat{S}_R$	168,36	52,64	18,61	7,81	4,01	2,45	2,15	6,34	21,32

Como se puede apreciar, los valores de la Tabla 31 indica que no se puede mejorar la regresión transformando sólo la variable respuesta, ya que el valor mínimo de $\hat{S}_R$ corresponde a $\lambda=1$. Por ello, se llevaron a cabo nuevas regresiones, utilizando como variable explicativa $\sqrt{x}$ ($\lambda_2 = 0,5$) y $\ln x$ ($\lambda_2 = 0$). Los resultados de cada una de estas regresiones son mostrados en las Tablas 33 y 34:

Tabla 32: Valores de varianza residual. Variable explicativa $\ln(x)$

λ	-2	-1,5	-1	-0,5	0	+0,5	+1	+1,5	+2
$\hat{S}_R$	140,80	40,84	12,73	4,18	1,45	2,364	6,04	15,00	38,8

Tabla 33: Valores de varianza residual. Variable explicativa $\sqrt{x}$

λ	-2	-1,5	-1	-0,5	0	+0,5	+1	+1,5	+2
$\hat{S}_R$	158,47	48,34	16,40	6,33	2,679	1,160	3,113	10,09	29,62

A la vista de los resultados, se observa que la regresión realizada con los valores $\lambda_1 = 0,5$ y $\lambda_2 = 0,5$ (es decir, $\sqrt{x}$ y $\sqrt{y}$) es la que menor error residual presenta y por tanto, son las variables más adecuadas a utilizar.

De este modo, si se lleva a cabo la estimación de una nueva regresión con dichas variables a través del programa SPSS se obtiene las siguientes tablas:

Tabla 34: ANOVA del modelo de regresión simple

Modelo	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Regresión	112,235	1	112,235	1393,648	0,000 ^a
Residual	2,819	35	0,081		
Total	115,054	36			

Tabla 35: Coeficientes de regresión

Modelo	Coeficientes no estandarizados		Coeficientes estandarizados	t	Sig.
	B	Error típ.	Beta		
(Constante)	0,246	0,081		3,058	0,004
Volumen	0,225	0,006	0,988	37,332	0,000

Variable independiente: $\sqrt{\text{Volumen}}$

Variable dependiente: $\sqrt{\text{Peso}}$

Al igual que en el caso anterior, el nivel de significación observado es menor de 0,05, lo que afirma la existencia de una asociación entre ambas variables, quedando resumida de la siguiente forma:

$$\sqrt{y} = 0,246 + 0,225 \sqrt{x} \quad \hat{S}R = 0,284 \quad R^2 = 0,976$$

Donde:

- Y es el peso seco en gramos (g)
- X es el volumen en centímetros cúbicos (cm³)

Si se comparan los resultados obtenidos tras la transformación con respecto al modelo original, se observa que el error estándar disminuye de 2,15 a 0,284, y que además se experimenta un ligero incremento del valor del coeficiente de determinación pasando de 0,965 a 0,976. Por tanto, se puede considerar *a priori* que se ha conseguido una mejora en el modelo de regresión, si bien antes de aceptarlo de forma definitiva es necesario llevar a cabo de nuevo una diagnosis de modelo que permita conocer si la aplicación de estas transformaciones hacen que se cumplan las hipótesis expuestas anteriormente.

Figuras 49 y 50: (Izq.) Diagrama de dispersión de pronósticos tipificados por residuos tipificados. (Der.) Gráfico de probabilidad normal de los residuos

Para ello, se recurrió de nuevo a los diagramas de dispersión de residuos tipificados y al gráfico de probabilidad normal de residuos para la comprobación. En el primer caso (Figura 49), se observa que existe una mejor dispersión de los residuos a lo largo del diagrama, siendo éstos más simétricos y con menor anchura con relación a la línea horizontal central, lo que determina que se ha logrado una mejoría en la linealidad y homocedasticidad del modelo. Mientras, en el gráfico de probabilidad normal de los residuos (Figura 50), éstos se muestran mucho más próximos a la diagonal, lo que demuestra de este modo que también se ha logrado alcanzar la normalidad.

Además de haber conseguido que el nuevo modelo cumpla con todas las hipótesis, se quiso comprobar la existencia de observaciones influyentes que pudiesen perturbar el modelo. Para ello, se recurrió al cálculo de la distancia de Cook, en el que una observación se considera influyente si su distancia es superior al valor crítico $F_{2,n-2;\alpha}$. Si bien, algunos autores sugieren comparar la distancia de Cook directamente con el valor fijo 1 cuando n es pequeño (Coello y Maspoch, 2007). En el caso de los datos que componen el tamaño muestral utilizado en el presente estudio, éstos presentan distancias de Cook que oscilan entre 0,00 y 0,231, determinándose de este modo la inexistencia de observaciones influyentes y afianzando la validez del modelo presentado.

Por tanto, puede concluirse que, a través del estudio expuesto en el presente documento, se ha logrado obtener un modelo matemático que permite estimar de forma fiable la biomasa de un individuo de *Typha domingensis* (comprendido entre 13,9 y 260 cm de alto), a través del uso de técnicas sencillas, no destructivas, rápidas y aplicables in situ, como son las medidas de altura y el diámetro de la base. Todo ello posibilitará la realización de una mejor evaluación sobre la conveniencia de utilizar *T. domingensis* como tecnología de fitoextracción.

3.2.4.3. Aproximación de cantidad de metal extraído por fitoextracción utilizando el modelo matemático

Una vez obtenido y diagnosticado el modelo de biomasa de *T. domingensis*, se puede proceder al cálculo teórico de la cantidad de metal que se podría extraer por fitoextracción en un área determinada.

De este modo, se decidió llevar a cabo un ejemplo de su posible aplicación en uno de los puntos de muestreo utilizados en el presente estudio. El área escogida para tal fin fue el punto de muestreo VZ-7. Así, el procedimiento llevado a cabo fue el siguiente: se seleccionó una zona del río donde la densidad y la altura de *T. domingensis* fuese representativa del citado punto. A continuación, se delimitó dentro de ese punto un área de un metro cuadrado utilizando para ello un marco metálico. Posteriormente, a 15 individuos que tuvieran un tamaño medio representativo de los especímenes presentes en dicho metro cuadrado se les midieron los parámetros necesarios para ser utilizados en el modelo, es decir, altura máxima y diámetro mayor y menor de la base, para posteriormente ser calculado sus volúmenes. Además, también se calculó la densidad de plantas de espadaña en dicho punto, siendo los valores obtenidos:

- Volumen medio: 198,26 cm³.
- Densidad: 45 individuos/m².

Al aplicar el volumen medio de 198,26 cm³ en el modelo de biomasa, se obtiene que el peso seco medio de cada individuo de *T. domingensis* presente en ese punto es de 11,65 g. Si este valor es multiplicado por la densidad, se obtiene un peso seco de hoja por metro cuadrado de 542,52 g, lo que equivale a 0,524 kg m⁻² de biomasa. Así, el último paso que faltaría por realizar sería multiplicar el valor biomasa, por la concentración media de metal en parte aérea que llega a acumular *T. domingensis* en dicha zona, para conocer de esta manera la cantidad de ese metal que llegaría a extraerse por unidad de superficie. En la Tabla 36 se muestran las cantidades teóricas que se extraerían para cada uno de los metales.

Tabla 36: Cantidad teórica de metal extraído (mg m⁻²) en VZ-7

Localización	Cantidad de metal extraído por metro cuadrado (mg m ⁻²) en parte aérea			
	Hg	Pb	Zn	Cu
VZ-7	0,21	-	12,35	2,48

(Nota: Debido a que no se posee datos de concentración de Pb en hoja no se puede calcular la cantidad de metal a extraer).

Como se puede observar, el metal que se extraería en mayor cantidad sería el Zn, seguido por el Cu y Hg. Sin embargo, estas cantidades son muy bajas, en especial la del Hg, lo cual es un claro inconveniente, ya que al ser un metal sin función biológica y tóxico se hace primordial su eliminación del medio, y cuyo hecho se muestra difícil de realizar bajo las presentes condiciones de estudio, aunque se dejase crecer la planta hasta que empezase su senescencia.

3.2.5. Evaluación de *T. domingensis* para su uso en fitotecnología

Como se ha nombrado en apartados anteriores, dentro de las técnicas que engloban las fitotecnologías se encuentran las denominadas fitoextracción y fitoestabilización. Para la aplicación de una técnica u otra, la planta a utilizar debe de cumplir una serie de requisitos, que quedan resumidos en la Tabla 37:

Tabla 37: Criterios para la aplicación de técnicas de fitoextracción y fitoestabilización

Fitotecnología	TF	BAF	[Metal] _{Hoja}	Biomasa
Fitoextracción	> 1	> 1	> Umbral de hiperacumulación	Elevada
Fitoestabilización	< 1	> 1*	No se aplica	Elevada

*Para la fitoestabilización, el BAF > 1 debe ser en la parte radicular

Como se puede apreciar, las requerimientos necesarios para que una determinada especie pueda ser aplicada en la fitoextracción se encuentran centrados en que ésta acumule la mayor cantidad de metal posible en la hoja ya que después esta fracción será recogida (Mganga et al., 2010). Mientras que para la fitoestabilización, se espera que exista una acumulación efectiva en su parte radicular (Yoon et al., 2006).

De esta forma, si atendemos a los resultados obtenidos en el presente trabajo, y expuestos en la Tabla 38, se aprecia *T. domingensis* sólo sigue el principio de BAF > 1 en lo que a fitoextracción respecta por lo que se descarta que esta planta pueda ser utilizada para este tipo de técnicas. Sin embargo, en los criterios establecidos para la fitoestabilización, la enea cumple con dichos requerimientos, ya que como se ha observado a lo largo del presente trabajo la mayor acumulación de metal se realiza en las raíces, independientemente del elemento que fuese y además su absorción se realiza de una forma eficiente.

Tabla 38: Resumen de valores de TF, BAF y umbrales de hiperacumulación en *T. domingensis*

Metal	¿TF > 1?	¿BAF > 1?		[Hoja] > Hiperacumulación
		Hoja	Raíz	
Hg	NO	SI	SI	NO
Pb	NO	SI	SI	NO
Zn	NO	SI	SI	NO
Cu	NO	SI	SI	NO

3.3. Relación de la acumulación de metales pesados en *Typha domingensis* con el sedimento

Un biomonitor es un organismo o parte de un organismo o comunidad de organismos que contienen información de aspectos cuantitativos de la calidad de un medio (Markert et al., 1999). De acuerdo con Wittig (1993) algunas de las propiedades que se requieren para usar una especie como biomonitor son: 1) Estar de forma representativa a lo largo del área que se pretende monitorizar, 2) Tener amplitud geográfica, 3) ser fácil de muestrear y 4) no existan problemas de identificación. El uso de macrófitas acuáticas como biomonitores de metales pesados de zonas contaminadas es conocido (Ali et al., 1999). En el caso de la especie *Typha*, existen variedad de estudios que demuestran la capacidad de *T. latifolia* para ser utilizada como biomonitor de Mn, Zn, Cd, Pb, Ni, Cu y Co (Klink et al., 2013), mientras que *T. domingensis*, la cual es menos estudiada, ha mostrado ciertos indicios de tener capacidad biomonitora en ambientes afectados por Zn y Pb (Fawzy et al., 2012).

En el presente trabajo, se quiso conocer si los individuos de *T. domingensis* que crecen en la Comarca de Almadén pueden ser utilizados como biomonitores. Para ello, se llevaron a cabo correlaciones bivariadas entre la concentraciones de metal en las diferentes partes de la planta y las concentraciones en el medio, siendo calculadas tanto para la fracción disponible como la total. Además, también se realizaron correlaciones entre los distintos órganos de la planta entre sí. Los resultados obtenidos para cada uno de los casos son mostrados en las Tablas 40 - 43.

Capítulo III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tabla 39: Correlaciones de concentración de Hg entre las diferentes fracciones y el sustrato

	[Hg] Total sedimento	[Hg] Disponible	Hoja	Núcleo radicular	Rizoma	Raíz
Hoja	0,325* (n=22)	0,290 ^{ns} (n=22)	1	0,432** (n=20)	0,509** (n=19)	0,621** (n=20)
Núcleo Radicular	0,621** (n=20)	0,495** (n=22)	0,432** (n=20)	1	0,569** (n=18)	0,663** (n=20)
Rizoma	0,333** (n=19)	0,345* (n=19)	0,509** (n=19)	0,569** (n=18)	1	0,569** (n=18)
Raíz	0,453** (n=20)	0,369* (n=20)	0,621** (n=20)	0,663** (n=20)	0,569** (n=18)	1

* Correlación es significativa al nivel 0,05

** Correlación es significativa al nivel 0,01; ns, no existe correlación significativa

Tabla 40: Correlaciones de concentración de Pb entre las diferentes fracciones y el sustrato

	[Pb] Total sedimento	Núcleo radicular	Rizoma	Raíz
Núcleo Radicular	0,411* (n=20)	1	0,029 ^{ns} (n=15)	0,337* (n=20)
Rizoma	-0,010 ^{ns} (n=15)	0,029 ^{ns} (n=15)	1	-0,048 ^{ns} (n=15)
Raíz	0,610** (n=21)	0,337* (n=20)	-0,048 ^{ns} (n=15)	1

* Correlación es significativa al nivel 0,05

** Correlación es significativa al nivel 0,01; ns, no existe correlación significativa

Tabla 41: Correlaciones de concentración de Zn entre las diferentes fracciones y el sustrato

	[Zn] Total sedimento	[Zn] Disponible	Hoja	Núcleo radicular	Rizoma	Raíz
Hoja	0,284 ^{ns} (n=20)	-0,229 ^{ns} (n=18)	1	0,316* (n=22)	0,379* (n=20)	0,385* (n=22)
Núcleo Radicular	0,458* (n=20)	0,046 ^{ns} (n=18)	0,316* (n=22)	1	0,295 ^{ns} (n=20)	0,394* (n=22)
Rizoma	0,124 ^{ns} (n=18)	-0,191 ^{ns} (n=17)	0,379* (n=20)	0,385* (n=22)	1	0,463** (n=20)
Raíz	0,242 ^{ns} (n=20)	-0,020 ^{ns} (n=18)	0,385* (n=22)	0,394* (n=22)	0,463 ^{ns} (n=20)	1

* Correlación es significativa al nivel 0,05

** Correlación es significativa al nivel 0,01; ns, no existe correlación significativa

Tabla 42: Correlaciones de concentración de Cu entre las diferentes fracciones y el sustrato

	[Cu] Total sedimento	[Cu] Disponible	Hoja	Núcleo radicular	Rizoma	Raíz
Hoja	-0,255 ^{ns} (n=22)	0,150 ^{ns} (n=16)	1	0,121 ^{ns} (n=22)	0,053 ^{ns} (n=20)	0,074 ^{ns} (n=22)
Núcleo Radicular	0,337 ^{ns} (n=22)	-0,544** (n=16)	0,121 ^{ns} (n=22)	1	0,132 ^{ns} (n=20)	0,321* (n=22)
Rizoma	0,053 ^{ns} (n=20)	-0,143 ^{ns} (n=15)	0,053 ^{ns} (n=20)	0,132 ^{ns} (n=20)	1	0,126 ^{ns} (n=20)
Raíz	0,169 ^{ns} (n=22)	-0,200 ^{ns} (n=16)	0,074 ^{ns} (n=22)	0,321* (n=22)	0,126 ^{ns} (n=20)	1

* Correlación significativa al nivel 0,05

** Correlación es significativa al nivel 0,01; ns, no existe correlación significativa

A la vista de los resultados se observa que el mercurio es el metal que presenta mayores correlaciones significativas entre las diferentes partes de la planta y el medio, aunque éstas suelen ser débiles, oscilando entre 0,325 y 0,621, siendo el núcleo radicular el órgano que presenta mejores correlaciones con el medio, ya sea tanto con la concentración total de mercurio en el sedimento como su fracción disponible. Además, otro aspecto a destacar en las relaciones con dicho metal son las que existen entre las distintas fracciones de la planta entre sí, siendo éstas positivas en todos los casos y con niveles de significación de 0,01.

Sin embargo, los resultados obtenidos con el resto de los metales muestra un panorama muy distinto al expuesto con el Hg, ya que las relaciones entre la planta y el medio en la mayoría de los casos son casi inexistentes, pudiéndose destacar en primer lugar, la correlación encontrada entre la concentración de plomo en las raíces y la concentración total en el sedimento (0,610; $p < 0,01$) y en segundo lugar, la relación negativa entre la concentración de Cu en el núcleo radicular y la concentración disponible de dicho metal en el sustrato (-0,544; $p < 0,01$).

De este modo, y pese a que la especie *T. domingensis* cumple las propiedades expuestas por Wittig (1993) para que una planta sea utilizada como biomonitora, las bajas correlaciones que existen entre la concentración de Hg en sus diferentes fracciones y el medio y las casi inexistentes para el resto de metales, hacen que *T. domingensis* no sea una buena candidata para ser utilizada como biomonitora en las condiciones de campo estudiadas.

3.4. Especiación de mercurio en muestras de planta por GC-pyro-AFS

En el presente apartado se van a mostrar los pasos que se han llevado a cabo en la evaluación y optimización de cada una de las etapas que componen los dos métodos escogidos para su posible aplicación en muestras vegetales.

3.4.1. Comprobación de la capacidad de extracción y medición de los métodos originales

El primer paso que se llevó a cabo fue evaluar la recuperación de metilmercurio que se obtenía al utilizar métodos previamente desarrollados para especiación de mercurio en muestras biológicas (Berzas Nevado et al., 2005) o sedimentos (Berzas Nevado et al., 2008). Para de este modo poder comprobar si dichos métodos eran ya de por sí aptos para su uso en matrices vegetales.

Para ello, muestras de la fracción hoja fueron dopadas con una disolución de metilmercurio hasta alcanzar una concentración final de 500 ng kg⁻¹. Tras la adición, las muestras fueron agitadas durante 24 horas para su correcta homogeneización y estabilización. Una vez transcurrido ese tiempo, se aplicó cada uno de los dos métodos; por un lado, la extracción alcalina con TMAH (25%, 2 ml) y una temperatura máxima de irradiación de 180 °C (Berzas Nevado et al., 2005) y por otro lado, la extracción ácida con HNO₃ 6 N y una temperatura máxima de irradiación de 80 °C (Berzas Nevado et al., 2008).

Los resultados obtenidos mostraron que, en el caso de la extracción con TMAH, la concentración de metilmercurio no pudo llegar a ser cuantificada ya que esta especie fue transformada a mercurio inorgánico durante la extracción. En cambio, las hojas dopadas y posteriormente tratadas con ácido nítrico, obtuvieron mejores rendimientos, con valores de recuperación que oscilaban entre el 60-70%, si bien estos porcentajes, aún distaban bastante de asegurar una extracción cuantitativa de las especies de mercurio.

Por lo tanto, y a la vista de los resultados, se procedió a evaluar la posibilidad de mejorar ambos métodos, a través de la modificación de diversos parámetros para poder adaptarlos a las matrices vegetales.

3.4.2. Modificación de las condiciones de derivatización y etilación

Antes de modificar los parámetros relacionados con la etapa de extracción que, en principio, debe ser la más determinante en las recuperaciones obtenidas, se decidió investigar las condiciones de derivatización y etilación, debido a que éstas son comunes para ambos procedimientos. Para la realización de dichas comprobaciones, se trabajó con extractos obtenidos a través del método de extracción con HNO₃.

De este modo, se realizó en primer lugar el estudio del volumen de extracto a utilizar en la derivatización. Para ello, se evaluó si la reducción de 2 ml a 1 ml de la cantidad de extracto utilizado en dicho paso, podría mitigar los inconvenientes derivados de esta compleja matriz. Sin embargo, las recuperaciones obtenidas al usar 1 ml, no mostraron diferencias notables al compararse con las alcanzadas con 2 ml de extracto. Por este motivo, se decidió que el volumen a utilizar en los siguientes ensayos a partir de ese momento sería de 2 ml, ya que de esta forma se podría mejorar en cierta parte la sensibilidad del método, sobre todo en aquellos casos donde fuese necesario llevar a cabo una preconcentración.

En segundo lugar, con respecto a la etapa de etilación, también se realizaron ensayos en los que se modificó la concentración del agente de etilación utilizado debido a que algunas matrices pueden precisar un mayor

porcentaje del mismo. Dichos ensayos, se basaron en aumentar la concentración de tetraetilborato de sodio del 3% al 6% (m/v), lo que derivó en un ligero incremento en la recuperación de metilmercurio añadido, pasando del $62,4 \pm 3,7\%$ al $71,6 \pm 5,9\%$. Es por ello, que ante la mejora del rendimiento observado, se estipuló que la concentración de agente etilante en los siguientes ensayos fuese del 6% (m/v).

Por lo tanto, y resumiendo lo expuesto en los párrafos anteriores, las nuevas condiciones que se aplicarían a partir de ese momento en los siguientes procedimientos sería:

- Cantidad de extracto utilizado en derivatización: 2 ml.
- Cantidad de agente etilante: 0,5 ml al 6%.

3.4.3. Optimización de extracción de metilmercurio con TMAH como agente extractante

Una vez estudiados los factores que afectan a la etapa de etilación, se procedió a optimizar cada uno de los métodos de extracción por separado, comenzando en este caso con la extracción alcalina. Los parámetros a evaluar fueron en primer lugar, la temperatura de extracción y, en segundo lugar, el volumen de TMAH utilizado. Para la determinación de la temperatura óptima se escogió de forma predeterminada un volumen de reactivo de 5 ml de TMAH y 5 ml de agua Milli-Q, y se llevaron a cabo extracciones a diferentes temperaturas, partiendo desde 80 °C y aumentándola en intervalos de 10 °C, hasta encontrar el punto donde se alcanzase la máxima recuperación. La decisión de comenzar los ensayos a temperaturas bajas fue debido a que, como se mencionó anteriormente, cuando se evaluó la recuperación que se obtenía al aplicar el método original de TMAH a 180 °C, se observó que todo el metilmercurio fue transformado a mercurio inorgánico. Además, las muestras de hojas expuestas a dicha temperatura mostraron un aspecto calcinado, lo que evidenciaba que se estaba operando a una temperatura excesivamente elevada para este tipo de matriz.

En la Tabla 43 y en las Figura 51 se exponen las recuperaciones de metilmercurio y mercurio inorgánico a diferentes temperaturas. Como se puede observar, la temperatura donde se obtuvieron las mejores recuperaciones, no sólo de metilmercurio, sino de mercurio inorgánico, fue a 100 °C.

Tabla 43: Recuperaciones de metilmercurio y mercurio inorgánico en muestras de hoja dopadas utilizando TMAH como agente extractante

Tª \ Volumen	MeHg (%)			IHg (%)		
	2 ml	5ml	8ml	2 ml	5 ml	8ml
80 °C	-	74 ± 8	-	-	95 ± 24	-
90 °C	-	70 ± 2	-	-	89 ± 16	-
100 °C	87 ± 8	94 ± 3	95 ± 10	85 ± 9	100 ± 12	94 ± 7

Figuras 51 y 52: Recuperación de metilmercurio (MeHg) y mercurio inorgánico (IHg) en hoja dopada variando: (Izq.) la temperatura de extracción ante un volumen constante TMAH de 5 ml (Der.) el volumen de reactivo de extracción manteniendo la temperatura a 100 °C

De esta forma, el siguiente paso que se realizó fue que, una vez fijada la temperatura a 100 °C, se llevaron a cabo extracciones en las que se modificaba el ratio TMAH:Agua como reactivo de extracción. Así, los volúmenes de TMAH evaluados fueron 2, 5 y 8 ml siendo el resto de volumen de agua hasta alcanzar los 10 ml en total, volumen mínimo necesario para un buen control de la presión y la temperatura por parte de la sonda del microondas. Los resultados correspondientes a dichas extracciones pueden verse en la Tabla 43 y Figura 52. A la vista de los resultados, puede apreciarse que una disminución en la cantidad de TMAH, empeora la recuperación de metilmercurio y mercurio inorgánico. En cambio, el aumento de 5 ml a 8 ml de TMAH no experimenta un cambio sustancial de rendimientos, pudiéndose dar por óptimos ambos volúmenes. Sin embargo, se decidió aceptar la cantidad de 8 ml como volumen adecuado de extractante para que de este modo se pudiera abrir la posibilidad a un aumento en la cantidad de muestra analizada, ya que un incremento de ésta, haría presumiblemente necesario una mayor cantidad del mismo.

Por tanto, una vez evaluadas cada una de las variables que podrían tener una influencia en la extracción alcalina, se puede concluir a priori que el nuevo método de especiación de Hg en plantas utilizando TMAH sigue el esquema mostrado en la Figura 53. Si bien, dichos resultados seguirían siendo preliminares, pues faltaría llevar a cabo los estudios de validación cuyos resultados serán mostrados en subapartados posteriores.

Figura 53: Esquema general de extracción alcalina (TMAH) de metilmercurio y mercurio inorgánico en muestras de hoja de *T. domingensis*

3.4.4. Optimización de extracción de metilmercurio con HNO_3 como agente extractante

Para la optimización de la extracción de especies de mercurio en muestras vegetales utilizando ácido nítrico, se realizaron en primer lugar diversos ensayos a diferentes temperaturas comprendidas entre 80 °C y 130 °C en intervalos de 10 grados cada uno. Las recuperaciones no fueron excesivamente buenas para ninguno de los casos, aunque fueron mejores a temperaturas bajas. Por tanto, el siguiente paso que se realizó fue aumentar el tiempo de radiación en microondas, de esta forma se incrementó a 10 minutos tanto el tiempo de rampa como el de mantenimiento de la temperatura cuando anteriormente ambos se situaban en 5 minutos.

Capítulo III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Así, con el nuevo programa de tiempos, se realizó una extracción a 80 °C donde se observó una mejoría muy significativa, ya que la recuperación pasó del $62,4 \pm 3,7$ % al $92,5 \pm 2,3$ % para la misma temperatura. El siguiente paso que se llevó a cabo, fue una comprobación similar a la realizada con el TMAH, donde se observaron si cambios en la temperatura producían un aumento en la recuperación. En la Figura 54 son expuestos los resultados obtenidos de los experimentos llevados a cabo a 80, 90 y 100 grados centígrados.

Figura 54: Porcentaje de recuperación de metilmercurio y mercurio inorgánico mediante extracción ácida en muestras de hoja de *T. domingensis* dopadas

Como se puede observar, incrementos en la temperatura no mostraron mejoría en la recuperación de ambas especies siendo la temperatura de 80 grados la más apropiada. Por lo tanto, el procedimiento global que dio mejores resultados a través de la extracción ácida en muestras dopadas de *T. domingensis* queda expuesto en la Figura 55.

Figura 55: Esquema general de extracción ácida (HNO_3 6 N) de metilmercurio y mercurio inorgánico en muestras de *T. domingensis* dopadas

Si bien, y al igual que en el caso anterior con el método alcalino, éstas serían las mejores condiciones preliminares para una correcta extracción ácida a falta del estudio de validación expuesto en el apartado 3.4.6.

3.4.5. Estudio para el aumento de la cantidad de muestra añadida

Antes de continuar con la validación de los métodos, otro aspecto que se evaluó para tratar de mejorar la sensibilidad fue aumentando la cantidad de muestra de 0,2 a 0,4 g. Dichas pruebas se realizaron a ambos métodos de extracción y las recuperaciones obtenidas en este caso no mejoraron con respecto a las anteriores y por lo tanto se decidió mantener como cantidad óptima de la muestra en 0,2g.

3.4.6. Validación de los métodos mediante materiales certificados de referencia

Como se ha nombrado anteriormente, una vez realizados los estudios iniciales que determinaron las mejores condiciones para la extracción (tanto alcalina como ácida) y posterior análisis de especies de Hg en muestras de hoja de *T. domingensis*, se procedió a la validación de dichos procedimientos. Para conseguir dicho fin, se recurrió a la utilización de materiales certificados de referencia o también denominados CRM por sus siglas en inglés.

En este caso, el CRM empleado fue el denominado comercialmente como BCR-060, debido a que su matriz proviene de la planta acuática *Lagarosiphon major*. Pero además, de forma adicional, se quiso conocer si alguno de estos dos métodos podrían ser aplicados a otro tipo de matrices orgánicas diferentes al de planta, por lo que las siguientes pruebas también se realizaron con el material certificado BCR-482 y cuya matriz es liquen de la especie *Pseudevernia furfuracea*. Dichos materiales de referencia fueron suministrados por el *Institute for Reference Materials and Measurements* (IRMM).

Por tanto, el primer paso llevado a cabo fue comparar la concentración de Hg total que se obtenía mediante la suma de especies a través de los métodos de extracción con el valor certificado de los CRM, ya que ambos materiales están certificados sólo para su concentración de Hg total. En la Tabla 44 se muestra dicha comparativa.

Tabla 44: Comparativa de concentraciones de mercurio total certificado y los obtenidos (por suma de especies) mediante extracción ácida y alcalina

Material de referencia certificado	Concentración de Hg total certificada (mg kg ⁻¹)	Concentración Hg total medida (mg kg ⁻¹) (n=5)	
		Extracción ácida	Extracción alcalina
BRC-060 (Planta acuática)	0,340 ± 0,040	0,333 ± 0,018	0,344 ± 0,049
BCR-482 (Liquen)	0,480 ± 0,020	0,484 ± 0,013	0,458 ± 0,048

Los resultados obtenidos muestran que no se detectaron trazas de metilmercurio en ninguno de los CRM por lo que se pudo considerar que dichas concentraciones de Hg total corresponden con el contenido en mercurio inorgánico analizado. Además como se puede observar, los valores alcanzados mediante las extracciones están en concordancia con los certificados, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los casos al nivel de significación del 95% (test t de Student).

La inexistencia de materiales de referencia certificados en especies de Hg correspondientes a la matriz estudiada, implica que para evaluar la eficacia de los métodos propuestos en la recuperación de MeHg en los CRM hubiera que realizar adiciones de concentraciones conocidas de MeHg a los mismos, tal y como se había hecho en la etapa anterior de optimización de los métodos en la que se trabajó con planta real adicionada con MeHg. El hecho de no haber encontrado MeHg en ninguno de los CRM en las determinaciones anteriormente indicadas permite afirmar que toda señal de MeHg detectada en los ensayos posteriores provendría del dopado al que serían sometidos estos materiales y en el caso de que se registraran aumentos en la concentración de IHg, estos procederían de la interconversión del MeHg añadido.

Capítulo III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Así, se procedió al dopado de los materiales de referencia para que tuviesen una concentración final de 500 ng g⁻¹ de MeHg, realizando a continuación ambas extracciones y siendo sus resultados expuestos en la Tabla 45:

Tabla 45: Porcentajes de recuperación de metilmercurio y mercurio inorgánico en materiales de referencia (n=5)

Material certificado	Extracción ácida		Extracción alcalina	
	%MeHg	%IHg	%MeHg	%IHg
BCR-60 (Planta acuática)	101 ± 6	98 ± 5	98 ± 4	101 ± 14
BCR-482 (Líquén)	98 ± 2	101 ± 3	100 ± 15	96 ± 10

De acuerdo con dicha tabla, tanto las recuperaciones de MeHg como las de IHg fueron próximas al 100% para ambas extracciones, lo que permitió por un lado, confirmar la ausencia de interconversiones entre ambas especies, y por otro lado, la capacidad de los dos métodos para extraer y determinar de forma simultánea y cuantitativa la concentración de IHg y MeHg tanto en plantas acuáticas como en líquenes.

Si bien, ante estos buenos resultados, se quiso comprobar cuánto de válidos eran estos procedimientos y si existía alguna diferencia entre ellos en términos de exactitud y precisión, por lo que se compararon en los siguientes aspectos:

- **Exactitud:** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las concentraciones de las especies de mercurio (MeHg dopado y mercurio inorgánico nativo) obtenidas (n=14) por ambos métodos (test de la t de Student, nivel de confianza del 95%).
- **Precisión:** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas al comparar las precisiones de las concentraciones obtenidas (n=14) mediante ambos métodos (test de la F de Snedecor, nivel de confianza del 95%).
- **Repetitividad de cada método:** En la extracción ácida, el porcentaje de desviación estándar relativa (RSD) calculada mediante la realización de 8 mediciones consecutivas fue menor del 5,5% para ambas especies de mercurio, mientras que en la extracción alcalina fue inferior al 7,5%.
- **Reproducibilidad entre días consecutivos:** Los valores obtenidos (n=8) entre dos días consecutivos fueron estadísticamente iguales para ambos métodos (test de la F de Snedecor, nivel de confianza del 95%).

Por tanto, cumplidos los principios expuestos anteriormente puede concluirse que ambos métodos son equivalentes en términos de exactitud y precisión e igual de válidos para la especiación de mercurio. Sin embargo, otro aspecto importante a tener en cuenta son los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) que pueden llegar a conseguir dichos procedimientos, pues en muchos casos, la concentración de las especies de Hg en planta (sobre todo el metilmercurio), se encuentra a niveles muy bajos. Así, en la Tabla 46 se muestran los valores de LD y LC que pueden alcanzar ambas extracciones.

Tabla 46: Límites de detección y cuantificación del sistema GC-pyro-AFS para cada tipo de extracción

	Extracción ácida		Extracción alcalina	
	MeHg	IHg	MeHg	IHg
Límite de detección (ng g ⁻¹)	25	22	25	30
Límite de cuantificación (ng g ⁻¹)	84	75	84	99

Como se puede observar, estos límites pueden considerarse bastante elevados, haciendo que no sea aceptable el uso de estos métodos cuando las concentraciones de las especies de mercurio son demasiado bajas. Por

tanto, antes esta situación, es necesario llevar a cabo un proceso de preconcentración que permita mejorar estos valores.

Para la optimización del proceso de preconcentración se eligió el material de referencia NCS ZC73027 suministrado por el *China National Analysis Center for Iron and Steel*, cuya matriz es arroz (*Oryza sativa*). Los motivos de esta elección fueron:

1. Es uno de los CRM de componente vegetal con la menor concentración total de mercurio que se comercializaba en el momento del estudio ($4,8 \pm 0,8 \text{ ng g}^{-1}$) y la cual se encuentra por debajo de los límites de detección de ambos métodos.
2. La capacidad de validar alguno de estos métodos para su posterior aplicación en muestras de arroz sería de gran utilidad, debido a que éste es el segundo cereal más producido a nivel mundial (FAOSTAT, 2013), y dado a que crece en suelos anegados, se propicia la formación de metilmercurio y su posterior acumulación en la planta. Un ejemplo que se puede destacar sobre este hecho sería lo que sucede en la región china de Guinzhou, donde el arroz llega a ser la principal ruta de exposición a MeHg, superando en este caso al pescado, debido a que en dicha zona además del cultivo de este cereal se realiza la explotación de mercurio (Li et al., 2012).

Así, el primer paso llevado a cabo fue la aplicación de cada uno de los métodos al CRM de arroz sin dopar realizando además el proceso de preconcentración de acuerdo a lo descrito en el apartado 2.2.3.4. Gracias a este paso previo, se alcanzaron recuperaciones próximas al 100% (Tabla 47) tanto en la extracción alcalina como en la ácida encontrándose todo el mercurio en forma inorgánica.

Tabla 47: Recuperación de mercurio inorgánico aplicando preconcentración en muestras de NCS ZC73027

	% de mercurio recuperado	
	Extracción ácida	Extracción alcalina
Mercurio nativo	98 ± 6	103 ± 16

Obtenidos estos buenos resultados, se continuó con el dopado del CRM, disminuyendo de forma notable la concentración de metilmercurio con respecto a las adiciones anteriores, haciendo que la concentración final de MeHg fuese de 10 ng g^{-1} . Posteriormente, se llevaron de nuevo a cabo los dos métodos de extracción, aplicando además el proceso de preconcentración. En este caso, los porcentajes de recuperación de IHg y MeHg mediante la extracción ácida fueron próximas al 100% para ambas especies, mientras que en el método alcalino se observó un incremento del mercurio inorgánico con respecto al certificado de forma bastante acusada, a la vez que el MeHg recuperado disminuía hasta el 70%, lo cual indica de la existencia de una posible interconversión entre especies (Tabla 48). Los límites de detección que se pudieron lograr tanto para el mercurio inorgánico como el metilmercurio comprendieron entre $0,7$ y 1 ng g^{-1} para ambos métodos.

Tabla 48: Recuperación de especies de mercurio aplicando preconcentración en muestras dopadas de NCS ZC73027

	% de especie de mercurio recuperado	
	Extracción ácida	Extracción alcalina
Mercurio inorgánico	97 ± 5	> 150
Metilmercurio	99 ± 5	70 ± 2

Por tanto, y teniendo en cuenta todos los resultados expuestos anteriormente, se puede afirmar que se ha llegado a alcanzar el desarrollo y validación de un nuevo método para la determinación simultánea de especies de Hg en matrices vegetales basado en la extracción ácida.

3.4.7. Comparación con otros métodos utilizados en la extracción de metilmercurio en plantas

Algunas de las propiedades que caracterizan al método que ha sido desarrollado en la presente tesis pueden resumirse de la siguiente manera:

- **Rápido:** Debido a que el tiempo empleado para la extracción, derivatización y análisis de una muestra conlleva menos de una hora.
- **Fiable:** Los ensayos han sido realizados sobre muestras reales y cuya matriz es vegetal, lo cual asemeja los posibles problemas que puedan aportar este tipo de material. A lo que se le añade su posterior validación con materiales certificados de referencia.
- **Simultáneo:** Este método permite extraer y analizar de forma simultánea mercurio inorgánico y metilmercurio.

Por tanto, será el tiempo, la exactitud y las especies medidas, los factores que permitan comparar este método con otros ya existentes. En la Tabla 49, se muestra un resumen bibliográfico de diferentes trabajos en los que ha sido desarrollado y/o aplicado algún método de extracción de metilmercurio en muestras vegetales.

De este modo, si se atiende en primer lugar a la variable tiempo, se observa que el uso del microondas para llevar a cabo la extracción, es determinante para poder reducir la duración del método, ya que como se puede apreciar, existe una gran diferencia entre aquellos trabajos en los que la extracción es asistida por microondas, de los que no. En el caso de los primeros, dicho paso conlleva una duración que oscila entre los 2 y 5 minutos, mientras que en los segundos estudios, el tiempo de extracción puede durar desde una hora a toda la noche. En el presente trabajo, el uso de microondas ha hecho que sólo sean necesarios 20 minutos (30-45 minutos si incluimos el periodo de enfriamiento), para llevar a cabo la extracción. Este tiempo puede parecer en desventaja al empleado en otros trabajos con microondas. Si bien, muchos de estos procedimientos están llevados a cabo utilizando microondas focalizados donde sólo una muestra puede ser irradiada a la vez, a diferencia del modelo de microondas empleado en el presente método en el que hasta 10 extracciones pueden realizarse de forma simultánea.

Con respecto a la comprobación llevada a cabo para conocer la exactitud del método, algo más del 50% de los estudios expuestos en la tabla utilizan patrones cuya matriz no es vegetal, usando en su caso patrones de sedimentos, peces o crustáceos y considerando que las buenas recuperaciones conseguidas con dichos patrones serán también alcanzadas en las muestras de planta analizadas. En cambio, la otra mitad de los estudios encontrados, ha recurrido al igual que en la presente tesis, al dopado de patrones vegetales o muestras reales para conocer los porcentajes de recuperación. Un caso a destacar por diferir del resto, son los trabajos llevados a cabo por Canário et al. (2006, 2010), cuyos estudios sobre metilmercurio en plantas fueron desarrollados utilizando un método analítico donde el material de referencia empleado era el IAEA 140/TM, el cual se encuentra actualmente descatalogado, y cuya matriz pertenece a un alga parda.

Por último, la posibilidad de medir de forma simultánea diferentes especies de mercurio se encuentra relacionada con el factor tiempo, ya que permite un ahorro considerable del mismo, evitando tener que llevar a cabo diversas extracciones para cada uno de los compuestos. De esta forma, en sólo 2 de los 16 métodos expuestos en la tabla, se ha conseguido realizar la extracción y medición simultánea de más de una especie de mercurio. Estos trabajos son los llevados a cabo por los investigadores Gentès et al. (2013) y Lin et al. (2008). Si bien, analizando cada uno de estos estudios, se puede observar que:

- a. En el caso de Gentès et al. (2013), donde se realizaron extracciones simultáneas de IHg y MeHg en plantas macrófitas, se utilizó un método basado en el desarrollado por Monperrus et al. (2005, 2007) para la especiación de mercurio en aguas. Además en este caso, como sistema de calidad se utilizó un material de referencia certificado cuya matriz era sedimento.
- b. En cambio, el estudio desarrollado por Lin et al. (2008), consiguió llevar a cabo la extracción simultánea de IHg, MeHg y EtHg en cereales, con tiempos de extracción muy cortos y utilizando para ello patrones dopados de harina de maíz y trigo, convirtiéndose de este modo en el método más completo encontrado hasta el momento en la bibliografía.

Por tanto, una vez observados y comparados aquellos aspectos que caracterizan a un método analítico y lo diferencian de otro, puede concluirse que el procedimiento desarrollado en la presente tesis aporta grandes ventajas con respecto a la gran mayoría de métodos ya existentes.

Tabla 49: Estudios de especiación de mercurio en muestras vegetales

Referencia	Simultaneidad	Método	Conclusiones	Patrón
Canário et al. (2006)	NO	• Masa: 0,23 – 0,27 g • Extractante: 6 – 8 ml HBr/CuSO₄ • Microondas: 75 W durante 2 min • Limpieza con Na₂S • Preconcentración con ditizona-tolueno • Detector: GC-ECD.	• LD: 346 pg g⁻¹ • LC: 986 pg g⁻¹ • Repetibilidad: 2,5% • Recuperación: 96% y 101%	• IAEA 140/TM (Fucus – Alga parda) - No disponible en la actualidad
Canário et al. (2010)	NO	• Extractante: 6 – 8 ml HBr/CuSO₄ • Microondas: 75 W durante 2 min. • Limpieza con CH₂Cl₂ • Preconcentración con H₂S • Reextracción con CH₂Cl₂ • Detector: GC-AFS	• LD: - • LC: - • Repetibilidad: <2,5% • Recuperación: 96 – 104%	• CRM-60 Planta acuática (DOPADO) • CRM-61 Musgo acuático (DOPADO) • IAEA 140/TM (Fucus – Alga parda) - No disponible en la actualidad
Gentès et al (2013)	-	• El método utilizado es de Monperrus et al. (2005, 2007) en aguas. • Masa : 0,250 g • Extractante : 5 ml de HNO₃ 6N • Microondas a 75W durante 4 min • Derivatización usando tetraetilborato de sodio al 1% • Detector : GC-ICPMS	- LD: - • Recuperación: > 83%	• IAEA 405 (Sedimento estuarino)
Göthberg et al. (2006)	NO	• Basado en métodos de Lee et al. (1994) • Extracción con H₂SO₄/KCl - Destilación • Etilación • Atrapamiento en carbotrap • Desorción • Detector: GC-AFS	LD: 0,06 ng g⁻¹	• IAEA-405 (Sedimento) • ERM-CC580 (Sedimento)
Hintelmann y Nguyen (2005)	NO	• Masa: 0,1 g • 5 ml de HNO₃ 4 M a 55 °C durante 16 horas • Extracto es diluido con 50 ml de agua Milli-Q • Ajuste de pH a 4,9 con tampón acetato • Etilación con tetraetilborato de sodio 2% w/v añadiendo 100 µL y dejándolo actuar durante 20 min • Purga con flujo de nitrógeno durante 20 min y atrapamiento en trampa Tenax® • Desorción • Detector: GC-ICPMS	- LD: 1 ng g⁻¹ • Recuperación: >95%	• NIST 1566b (Tejido de ostra) • TORT-2 (Hepatopáncreas de langosta) • DORM-2 (Proteína de pescado) • Acículas de pino dopadas

Capítulo III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Referencia	Simultaneidad	Método	Conclusiones	Patrón
Horvat et al. (2003)	NO	- Extracción con KBr-H₂SO₄ - Extracción del MeHgBr a tolueno - Limpieza con cisteína - Reextracción a benceno - Detector: GC-ECD	LD: 0.01–0.05 ng g⁻¹	
Li et al. (2008, 2010, 2012)	NO	- Basado en método de Qiu et al. (2008) - Detector : GC-CV-AFS	- LD: 0,002 ng g⁻¹ - Recuperación: 80 – 111% / 87 – 91%	- Muestras de arroz dopadas - TORT-2 (Hepatopáncreas de langosta)
Lin et al. (2008)	SI (IHg, MeHg, EtHg)	- Masa: 1 g (2 g para maíz) - Extracción con 10 ml mercaptoetanol al 0,5% v/v en 5% de metanol - Microondas (2 min de rampa, mantener durante 3 min a 60 °C) - Centrifugar 10 min Filtración de los extractos a 0,22 µm - Generación de vapor con NaBH₄ 0,1% m/v y HNO₃ 0,1% v/v - Detector: LC-VG-ICP-MS	- LD: 0.003 ng ml⁻¹ (para MeHg) - Repetibilidad: 1,8% - Recuperación: 92-98%	- NIST SRM 1568a harina de arroz (DOPADO) - NIST SRM 1567a Harina de maíz (DOPADO) - DOLT-3 (Hígado de tiburón) - Maíz y arroz de mercado dopado
Meng et al. (2010)	NO	Basado en el método de Qiu et al. (2008)		TORT-2 (Hepatopáncreas de langosta)
Meng et al. (2014)	NO	- Masa: 0,1 g - Extracción con 4 ml KOH/metanol al 25% (m/v) - Agitación durante 4 horas a 37 °C a 240 r.p.m. - Limpieza con CH₂Cl₂ durante una hora - Reextracción en agua calentando a 65 °C toda la noche - Detector: MERX Automatic Methylmercury System (GC-CVAFS)	- LD: - - Recuperación: 80,0 – 103,9%	- DORM-3 (Proteína de pescado) - TORT 2 (Hepatopáncreas de langosta) - ERM-CC580 (Sedimento)
Molina et al. (2010)	NO	- Masa: 2 – 5 mg. - Extractante: 0,5 ml KOH/MeOH durante 8h a 4 °C. - Derivatización con tetraetilborato de sodio - Atrapamiento en columna Tenax® - Detector: GC-CV-AFS	- LD: 2 ng g⁻¹ - LC: - - Repetibilidad: - Recuperación: 88 – 102%	- TORT – 2: (Hepatopáncreas de langosta) - DORM – 2 (Proteína de pescado)
Qiu et al. (2008)	NO	- Masa: 0,05 – 0,2 g - Extractante: 2 ml KOH/Metanol (25%) calentado a 75 °C durante 3 horas. - Limpieza con CH₂Cl₂/HCl - Evaporación de CH₂Cl₂ - Detector: GC-CV-AFS	- LD: 0,003 µg kg⁻¹ - Recuperación: 83 – 110%	- TORT-2 (Hepatopáncreas de langosta) - Muestra de arroz dopadas

Referencia	Simultaneidad	Método	Conclusiones	Patrón
Regier et al. (2012, 2013)	NO	MUESTRAS CAMPO • Masa: 50-100 mg • Extracción con TMAH en microondas a 80 W durante 4 min • Detector: GC-ICPMS MUESTRAS DE MICROCOSMOS • Masa: 0,3 g • Extracción con 2 ml de CuSO_4 (1M), 5 ml de HNO_3 (5 M) y 10 ml de CH_2Cl_2 agitado durante 1 hora • Centrifugación durante 25 min • Reextracción en agua durante 30 min a 50 °C • Atrapamiento en trampa Tenax ® • Detector: GC-CV-AFS	• LD: 0.05 $\mu\text{g kg}^{-1}$ • Recuperación: 91% - 106%	• TORT-2 (Hepatopáncreas de langosta) • ERM-CC580 (Sedimento)
Shi et al. (2005)	SI (MeHg, EtHg)	• Masa: 2 g • Extracción con 5 ml de agua Milli-Q y 4ml de KBr-CuSO_4 (3:1) • Agitación durante toda la noche • Limpieza con 6 ml de CH_2Cl_2 durante una hora • Reextracción con $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (0,01 M) • Agitación durante 45 minutos • Añade 0,3 ml KBr-CuSO_4 y 0,5 ml de CH_2Cl_2 • Agitación durante 30 minutos • Centrifuga durante 15 minutos • Detector: GC-AFS	• LD: 0,005 ng g^{-1} • Recuperación: 86% para MeHg y 77% para EtHg	• DORM-2 (Proteína de pescado) GBW08508 (harina de arroz (DOPADO))
Zhang et al. (2010)	NO	Basado en el método de Qiu et al. (2008)		

IHg: Mercurio inorgánico

MeHg: Metilmercurio

EtHg: Etilmercurio

3.4.8. Especiación de mercurio en *T. domingensis* en la Comarca Minera de Almadén

Una vez optimizado el método de extracción y determinación de especies de Hg en muestras vegetales, se quiso llevar a cabo una breve aplicación del mismo sobre muestras de *Typha domingensis* recogidas en el año 2013 y pertenecientes a distintas áreas del Distrito Minero de Almadén. Los puntos escogidos para tal fin fueron VZ-5, VZ-8 y AZ-1 los cuales, como se ha podido ver anteriormente, poseen distintas concentraciones de mercurio total, tanto en sedimento como en las diversas partes de la planta y se quería conocer si dicha tendencia también se observaba en el caso del metilmercurio.

De este modo, se procedió a la determinación de MeHg de cada una de las fracciones de *T. domingensis* utilizando para ello el método previamente desarrollado de extracción con HNO_3 . A su vez, también se llevó a cabo la extracción y determinación de MeHg de los sedimentos de dichas zonas utilizando en tal caso el procedimiento de Berzas Nevado et al. (2008). Todas las muestras analizadas fueron recogidas en el año 2013. En las Tablas 51 y 52 se muestran las concentraciones de metilmercurio y mercurio inorgánico en sedimento y planta para cada uno de los puntos de muestreo.

Capítulo III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Atendiendo en primer lugar a los resultados correspondientes a los sedimentos, el punto de muestreo que presentó la menor concentración de MeHg, fue el situado antes de la confluencia del río Valdezogues con el arroyo Azogado (VZ-5) con un valor de $8,71 \pm 0,47 \text{ ng g}^{-1}$. En cambio, los sedimentos correspondientes al arroyo Azogado (AZ-1), fueron los que tuvieron una mayor concentración, llegando a alcanzar $23,1 \pm 1,5 \text{ ng g}^{-1}$. En todos los casos, estas concentraciones supusieron menos del 0,03% del mercurio total presente en cada uno de los sedimentos.

Si se comparan estos resultados con los expuestos por Berzas Nevado et al. (2009) sobre muestras de sedimento recogidas en la Comarca de Almadén en el año 2006, se observa que, por un lado, la concentración de MeHg obtenida por dichos autores en un área próxima al punto VZ-5 del presente estudio fue de $8,6 \pm 0,7 \text{ ng g}^{-1}$, la cual se asemeja al valor de los sedimentos muestreados en 2013. Sin embargo, en otro punto analizado por los mismos autores y cercano a la localización VZ-8, la concentración de MeHg en sedimento en el año 2006 ascendía hasta $880 \pm 24 \text{ ng g}^{-1}$, 38 veces más en comparación al año 2013.

Tabla 50: Concentraciones de metilmercurio (ng g^{-1}), mercurio inorgánico y total ($\mu\text{g g}^{-1}$) y porcentaje de metilmercurio respecto al mercurio total, en diferentes muestras de sedimentos recogidos en el distrito minero de Almadén en el año 2013

Punto de muestreo	MeHg (ng g^{-1})	IHg ($\mu\text{g g}^{-1}$)*	Hg total ($\mu\text{g g}^{-1}$)	%MeHg respecto al total
VZ-5	$8,71 \pm 0,47$	39,7	$39,7 \pm 2,1$	0,021
VZ-8	$11,65 \pm 0,84$	421,3	422 ± 38	0,003
AZ-1	$23,1 \pm 1,5$	723,8	724 ± 39	0,003

*El mercurio inorgánico se calculó por diferencia respecto al total

Tabla 51: Concentración de metilmercurio y mercurio inorgánico (ng g^{-1}) y porcentaje de metilmercurio respecto al mercurio total, en diferentes fracciones de muestras de *Typha domingensis* recogidas en el distrito minero de Almadén en el año 2013

Punto de muestreo	Hoja			Núcleo radicular			Rizoma			Raíz		
	MeHg (ng g^{-1})	IHg (ng g^{-1})	% de MeHg	MeHg (ng g^{-1})	IHg (ng g^{-1})	% de MeHg	MeHg (ng g^{-1})	IHg (ng g^{-1})	% de MeHg	MeHg (ng g^{-1})	IHg (ng g^{-1})	% de MeHg
VZ-5	$3,58 \pm 0,25$	47 ± 16	7,62	$17,7 \pm 2,0$	2617 ± 281	0,68	$14,7 \pm 6,1$	532 ± 44	2,76	$18,5 \pm 3,9$	960 ± 25	1,93
VZ-8	$13,7 \pm 2,0$	$209 \pm 8,2$	6,56	$25,5 \pm 4,6$	711 ± 32	3,59	$21,0 \pm 4,2$	1781 ± 163	1,18	113 ± 41	5361 ± 253	2,11
AZ-1	$5,4 \pm 1,1$	555 ± 27	0,97	$70,7 \pm 4,8$	5905 ± 45	1,20	$6,80 \pm 0,46$	417 ± 52	1,63	$31,7 \pm 1,8$	2225 ± 369	1,42

En la Figura 56, se muestran las concentraciones de MeHg en las distintas muestras de *T. domingensis* analizadas. Como se puede apreciar, los menores valores de mercurio orgánico en cada uno de los puntos de muestreo se registraron en las hojas, los cuales oscilaban entre $3,58 \pm 0,25$ y $13,7 \pm 2,0 \text{ ng g}^{-1}$. Después de las hojas, los rizomas fueron las fracciones que presentaron una menor concentración de metilmercurio en cada uno de los puntos estudiados, siendo por tanto los núcleos radiculares y las raíces, los órganos donde se obtuvieron las mayores concentraciones de este compuesto, pudiendo destacar el valor de $70,7 \pm 4,8 \text{ ng g}^{-1}$ de MeHg en los núcleos radiculares del punto AZ-1 y la concentración de $113 \pm 41 \text{ ng g}^{-1}$ en las muestras de raíz correspondientes a la localización VZ-8. Dichos resultados, como se ha podido apreciar, muestran una mayor preferencia por la acumulación de MeHg en la parte subterránea de la planta, con una baja translocación hacia las hojas (Tabla 52), siendo este comportamiento común a otras especies como pueden ser: *Elodea nuttallii* (Regier et al., 2013), *Sarcocornia fruticosa*, *Halimione portulacoides*, *Spartina marítima* (Canário et al., 2007, 2010), *Vaccinium myrtillus*, *Calamagrostis villosa* o *Deschampsia flexuosa* (Schwesig y Krebs, 1998).

Figura 56: Concentración de metilmercurio en muestras de *T. domingensis* y en sedimento recogidas en el año 2013

Tabla 52: Factores de traslocación de metilmercurio en *T. domingensis*

FT	
VZ-5	0,19
VZ-8	0,12
AZ-1	0,17

Por último, para poder conocer el grado o la capacidad de acumulación de MeHg en *T. domingensis*, se llevó a cabo el cálculo del factor de bioacumulación de cada una de las fracciones, quedando dichos valores expuestos en la Tabla 53. Como puede observarse, en la mayoría de los casos el valor de BAF es mayor de 1, lo cual demuestra la tendencia de acumulación de este compuesto dentro de la planta. Sin embargo, cabe destacar que algunos autores como Göthberg y Greger (2006) plantean la hipótesis de que no todo el mercurio orgánico presente en una planta procede de la acción de las bacterias que habitan en el sedimento en el que ella se desarrolla (y el cual es posteriormente absorbido a través de la raíces), sino que, existe la posibilidad de que parte de dicho MeHg se genere dentro de los tejidos de la misma a través de la acción de microorganismos endofíticos. No obstante, el conocimiento referido a dicha hipótesis es en la actualidad muy limitado, por lo que se hace necesario mayores investigaciones al respecto.

Tabla 53: Factor de bioacumulación de metilmercurio en muestras de *T. domingensis*

	VZ-5	VZ-8	AZ-1
Hoja	0,4	1,2	0,2
Núcleo	2,0	2,2	3,1
Rizoma	1,7	1,8	0,3
Raíz	2,1	9,7	1,4

Capítulo IV: CONCLUSIONES

Las conclusiones que se presentan a continuación pueden dividirse de acuerdo con los objetivos planteados en la sección 1.5. Objetivos.

Objetivo 1: Estudio de la acumulación de metales pesados por *Typha domingensis*.

- Las mayores concentraciones de Hg, Pb y Zn detectadas en los sedimentos analizados, procedieron de los recogidos en el arroyo Azogado y de los puntos del río Valdeazogues situados después de la confluencia con dicho arroyo. En cambio, los valores de Cu mostraron una tendencia constante a lo largo de toda la cuenca.
- La concentración relativa a la fracción de metal fácilmente disponible en los sedimentos es muy baja, pudiendo destacar sobre todo el caso del mercurio con porcentajes comprendidos entre el 0,06 y el 0,44% del mercurio total presente en el sedimento.
- La distribución de los metales estudiados en *Typha domingensis* queda resumida de la siguiente forma: raíz $\geq$ núcleo radicular $\geq$ rizoma $\geq$ hoja. Donde queda patente que la raíz es el órgano donde se suele registrar las mayores concentraciones de metales, mientras que las hojas fueron donde se obtuvieron los valores más bajos.
- Por tanto, y de acuerdo con lo expuesto anteriormente, existe una escasa migración de metales desde la raíz hasta la hojas quedando patente en el factor de translocación, donde en la mayoría de los casos su valor fue inferior a 1.
- Al comparar las concentraciones de metal fácilmente disponible con el acumulado en los tejidos de la planta (BAF) se observa que existe un flujo positivo de metales desde el sedimento hacia la planta siendo además bastante eficiente debido en muchos casos a la baja concentración de metal disponible.
- Las concentraciones de metales en hoja obtenidas no superaron los valores umbrales de hiperacumulación.
- Se ha podido desarrollar un modelo para el cálculo de la biomasa aérea en *Typha domingensis* a través de técnicas no destructivas, necesitando para ello sólo la medición de la longitud de los ejes mayores y menores de la base y la altura de la planta.
- La baja translocación y concentraciones en hoja inferiores a los umbrales de hiperacumulación hacen que *Typha domingensis* no sea propicia para su uso en técnica de fitoextracción. Sin embargo, su alta eficiencia en la acumulación de metales en las raíces hace que esta planta sea buena candidata para ser utilizada en tecnologías de fitoestabilización.
- Las bajas o nulas correlaciones entre las concentraciones de metales en el medio y las presentes en las diferentes fracciones de la planta, hacen que *Typha domingensis* no pueda ser susceptible a ser utilizada como especie biomonitora.

Objetivo 2: Optimización de un método analítico para la especiación de mercurio en plantas.

- Se ha logrado la adaptación de los procedimientos de extracción y medición de metilmercurio desarrollados por Berzas Nevado et al. (2005) y Berzas Nevado et al. (2008) para su aplicación en muestras vegetales.
- Dichos métodos, especialmente el basado en la extracción ácida, han podido ser validados utilizando para ello materiales certificados de referencia, no sólo de matriz vegetal sino también de líquen.
- Además de la extracción de metilmercurio, se ha conseguido que mediante este procedimiento sea posible llevar a cabo la extracción y medición de mercurio inorgánico al mismo tiempo.
- Los resultados obtenidos aplicando el método a muestras reales de *T. domingensis* procedentes del distrito minero de Almadén mostraron una mayor acumulación de metilmercurio en la parte subterránea siendo en muchos casos superior a la concentración presente en el sedimento circundante.

Capítulo V: BIBLIOGRAFÍA

Acosta, J.A., Jansen, B., Kalbitz, K., Faz, A., Martínez-Martínez, S. "Salinity increases mobility of heavy metals in soils". *Chemosphere*. 2011, vol. 85, p. 1318 – 1324.

Adriano, D.C. *Trace elements in the Terrestrial Environments*. 2ª Edición. Nueva York: Springer. 2001.

AEMET – Agencia Estatal de Meteorología. 2014. Último acceso: 03-07-2014. Disponible en web: <http://www.aemet.es/>.

Aguilar Martínez, R. "Desarrollo del muestreador pasivo chemcatcher para la monitorización y cuantificación mediante GC-ICP-MS de mercurio y compuestos organoestánicos en medios acuáticos". 2010. Tesis Doctoral. UCM Madrid.

Albers, J., Cavender, G., Levine, S., Langolf, G.D. "Asymptomatic sensorimotor polyneuropathy in workers exposed to elemental mercury". *Neurology*. 1982, vol. 32, p. 1168-1174.

Ali, M.B., Tripathi, R.D., Rai, U.N., Pal, A., Singh, S.P. "Physico-chemical characteristics and pollution level of Lake Nainital (U.P., India): role of macrophytes and phytoplankton in biomonitoring and phytoremediation of toxic metal ions". *Chemosphere*. 1999, vol. 39, p. 2171–2182.

Alloway, B.J. Heavy metals in soils: *Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability*, Third Edition. Springer. 2013.

Álvarez Martín, J.B., Monseur Lespagnard, J., Gutiérrez Maroto, A., Guijarro Galiano, J. "Distribución Geoquímica de elementos traza en los sulfuros pirita y cinabrio y en las intercalaciones pizarrosas de la Capa de San Nicolás. Yacimiento de Almadén (Ciudad Real)". *Estudios Geológicos*. 1988, vol. 44, p. 181-187.

Angle, J.S., Linacre, N.A. "Metal phytoextraction – A survey of potential risks". *International Journal of Phytoremediation*. 2005, vol. 7, p. 241–254.

Anning, A.K., Korsah, P.E., Addo-Fordjour, P. "Phytoremediation of wastewater with *Limnocharis flava*, *Thalia geniculata* and *Typha latifolia* in constructed wetlands". *International Journal of Phytoremediation*. 2013, vol. 15, p. 452-464.

Appenroth, K.J. "Definition of "Heavy Metals" and their role in biological systems". En: Sherameti, I., Varma, A. (Eds.) *Soil Heavy Metals*. Berlin: Springer. 2010, p. 19 - 29.

Arnold, M.A., Lineberger, R.D., Struve, D.K. Copper compounds influence in vitro rooting of birch microcuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*. 1994, vol. 119, p. 74 – 79.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. "Support document to the 2013 priority list of hazardous substances that will be the subject of toxicological profiles". 2014. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.

ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. "Toxicity summary for methyl mercury". 1992. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.

- ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. “Toxicological profile for mercury”. 1999. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
- ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. “Toxicological profile of copper”. 2004. U.S. Department Health and Human Services, Atlanta, GA.
- ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. “Toxicological profile for zinc”. 2005. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.
- ATSDR – Agency for Toxic Substances and Disease Registry. “Toxicological profile of lead”. 2007. U.S. Department Health and Human Services, Atlanta, GA.
- Baker, A.J.M. “Accumulators and excluders-strategies in the responses of plants to heavy metals”. *Journal of plant nutrition*. 1981, vol. 3, p. 643 – 654.
- Baker, A.J.M., Whiting, S.N. “In search of the holy grail-a further step in understanding metal hyperaccumulation?”. *The New Phytologist*. 2002, vol. 155, p. 1 - 7.
- Beauford, W., Barber, J., Barringer, A.J. “Uptake and distribution of mercury within higher plants”. *Physiologia plantarum*. 1977, vol. 39, p. 261 – 265.
- Bernier, M., Popovic, R., Carpentier, R. “Mercury inhibition at the donor side of photosystem II is reversed by chloride”. *FEBS Letters*. 1993, vol. 321, p. 19-23.
- Berzas Nevado, J.J., García Bermejo, L.F., Rodríguez Martín Doimeadios, R.C. “Distribution of mercury in the aquatic environment at Almadén, Spain”. *Environmental Pollution*. 2003, vol. 122, p. 261 - 271.
- Berzas Nevado, J.J., Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Guzmán Bernardo, F.J., Jiménez Moreno, M. “Determination of Hg species in fish reference materials by gas chromatography-atomic fluorescence detection after closed-vessel microwave-assisted extraction”. *Journal of chromatography A*. 2005, vol. 1093, p. 21 – 28.
- Berzas Nevado, J.J., Rodríguez Martín-Doimeadios, Guzmán Bernardo, F.J., Jiménez Moreno, M. “Determination of monomethylmercury in low- and high-polluted sediments by microwave extraction and gas chromatography with atomic fluorescence detection”. *Analytica chimica Acta*. 2008, vol. 608, p. 30-37.
- Berzas Nevado, J.J., Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Jiménez Moreno, M. “Mercury speciation in the Valdeazogues River-La Serena Reservoir system: Influence of Almadén (Spain) historic mining activities”. *Science of the total environment*. 2009, vol. 407, n. 7, p. 2372-2382.
- BGS - British Geological Survey. “World mineral statistics 1970 to 1974”. 1978. London: Institute of geological science.
- BGS - British Geological Survey. “World mineral statistics 1980 to 1984”. 1986. Keyworth, Nottingham: British Geological.
- BGS - British Geological Survey. “World mineral statistics 1990 to 1994”. 1995. Keyworth, Nottingham: British Geological.
- BGS - British Geological Survey. “World mineral statistics 2000 to 2004”. 2006. Keyworth, Nottingham: British Geological.
- BGS – British Geological Survey. “World mineral production 2008-2012”. 2014. Keyworth, Nottingham: British Geological Survey.
- Bloom, N.S. *Sampling and analysis for mercury in environmental media of importance to the natural gas industry*. GRI Topical Report Gas Research Institute. 1993.
- Bloom, N.S., Colman, J.A., Barber, L. “Artifact formation of methyl mercury during aqueous distillation and alternative techniques for the extraction of methyl mercury from environmental samples”. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*. 1997, vol. 358, p. 371-377.
- Bravo, A.G., Cosio, C., Amouroux, D., Zopfi, J., Chevalley, P.A., Spangenberg, J.E., Ungureanu, V.G., Dominik, J. “Extremely elevated methyl mercury levels in water, sediment and organisms in a Romanian reservoir affected by release of mercury from a chlor-alkali plant”. *Water Research*. 2014, vol. 49, p. 391 – 405.

- Broadley, M.R., White, P.J., Hammond, J.P., Zelko, I., Lux, A. "Zinc in plants". *New Phytologist*. 2007, vol. 173, p. 677 – 702.
- Brookins, D.G. *Eh-pH Diagrams for Geochemistry*. New York: Springer-Verlag. 1988.
- Brooks, R. R., Lee, J., Reeves, R. D., Jaffré, T. "Detection of metalliferous rocks by analysis of herbarium specimens of indicator plants". *Journal of Geochemical Exploration*. 1977, vol. 7, p. 49-77.
- Callister, W.D. *Introducción a la ciencia e ingeniería de los materiales*. Molera Solà, Pere; Anglada Gomila, Marc J. (Vers. Española). 1ª Edición. España: Reverte, 1996. ISBN: 978-84-291-7252-2.
- Calow, P.P. *River Biota: Diversity and Dynamics*. Oxford: Wiley-Blackwell. 2009. ISBN: 978-0-86542-716-7.
- Canário, J., Caetano, M., Vale, C. "Validation and application of an analytical method for monomethylmercury quantification in aquatic plant tissues". *Analytica chimica acta*. 2006, vol. 580, p. 258–62.
- Canário, J., Vale, C., Poissant, L., Nogueira, M., Pilote, M., Branco, V. "Mercury in sediments and vegetation in a moderately contaminated salt marsh (Tagus Estuary, Portugal)". *Journal of environmental sciences*. 2010, vol. 22, p. 1151–1157.
- Carcavilla, L., Palacios, J. *Geosites: aportación española al patrimonio geológico mundial*. Instituto Geológico y Minero de España. 2010.
- Cárdenas-Hernández, J.F., Moreno, L.P., Magnitskiy, S.V. "Efecto del mercurio sobre el transporte celular del agua en plantas. Una revisión". *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*. 2009, vol. 3, n. 2, p. 250 – 261.
- Cardwell, A. J., Hawker, D. W., Greenway, M. "Metal accumulation in aquatic macrophytes from southeast Queensland, Australia". *Chemosphere*. 2002, vol. 48, p. 653–663.
- Carranza-Álvarez, C., Alonso-Castro, A.J., Alfaro-De La Torre, M.C., García-De la Cruz, R.F. "Accumulation and distribution of heavy metals in *Scirpus americanus* and *Typha latifolia* from an artificial lagoon in San Luis Potosí, México". *Water, air and soil pollution*. 2008, vol. 188, p. 297 – 309.
- Carrasco, L., Díez, S., Bayona, J.M. "Simultaneous determination of methyl- and ethyl-mercury by solid phase microextraction followed by gas chromatography atomic fluorescence detection". *Journal of Chromatography A*. 2009, vol. 1216, p. 8828 – 8834.
- Carrico, L.C. "Mercury". En: *Mineral facts and problems*. Washington, DC: U.S. Department of the Interior, Bureau of Mines. 1985, p. 499 - 508.
- Carro, A. M., Lorenzo, R. A., Vázquez, M. J., Abuín, M., Cela, R. "Different extraction techniques in the preparation of methylmercury biological samples: classic extraction, supercritical fluid and microwave extraction". *International Laboratory*. 1998, vol. 28, n. 7, p. 23 – 28.
- Chambers, P.A., Lacoul, P., Murphy, K.J., Thomaz, S. M. "Global diversity of aquatic macrophytes in freshwater". *Hydrobiologia*. 2008, vol. 595, p. 9–26.
- Chaney, R.L. "Zinc phytotoxicity". En Robson, A.D. (ed.). *Zinc in soil and plants*. The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993, p. 135-150.
- Chattopadhyay, S., Fimmen, R.L., Yates, B.J., Lal, V., Randall, P. "Phytoremediation of mercury and methyl mercury contaminated sediments by Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes*)". *International journal phytoremediation*. 2011, vol. 14, p. 142 - 161.
- Clarkson T.W. The toxicology of mercury. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 1997, vol. 34, p. 369 - 403.
- Coello, J., Maspoch, S. "Regresión lineal por mínimos cuadrados. Calibrado univariable". En: Blanco, M., Cerdà, V. *Temas avanzados de quimiometría*. España: Edicions UIB. 2007.
- Copper Alliance. 2014. Último acceso: 24/06/2014. Disponible en web: www.copperalliance.org.
- Davis, G., Mertz, W. "Copper". En: Mertz, W., ed. *Trace elements in human and animal nutrition*. 5ª Edición. San Diego: Academic Pr. 1987.
- Day, P.R. "Particle fractionation and particle-size analysis". En: Black, C.A. et al (ed.). "Methods of soil

analysis, Part I". *Agronomy*. 1965, vol. 9, p. 545-567.

De, A. K., Sen, A. K., Modak, D. P., Jana, S. "Studies of toxic effects of Hg (II) on *Pistia stratiotes*". *Water Air and Soil Pollution*. 1985, vol. 24, p. 351 - 360.

Diéguez Aranda, U., Barrio Anta, M., Castedo Dorado, F., Ruíz González, A. N., Álvarez Taboada, M. F., Álvarez González, J. G., Rojo Alboreca, A. *Dendrometría*. Madrid: Ediciones Mundi-Prensa. 2003.

Dietz, C., Madrid, Y., Cámara, C., Quevauviller, P. "The capillary cold trap as a suitable instrument for mercury speciation by volatilization, cryogenic trapping, and gas chromatography coupled with atomic absorption spectrometry". *Analytical Chemistry*. 2000, vol. 72, p. 4178 - 4184.

Donard, O.F.X., Lespes, G., Amouroux, D., Morabito, R. "Organotin compounds in the environment: Still a critical issue". En: *Trace Element Speciation for Environment, Food and Health*. Cambridge: Royal Society of Chemistry. 2001. ISBN: 978-0-85404-459-7.

Duffus, J.H. "Heavy metal - a meaningless term?". *Pure and applied chemistry*. 2002, vol. 74, p. 793-807.

Dunbabin, J.S., Bowmer, K.H. "Potential use of constructed wetlands for treatment of industrial wastewaters containing metals". *The science of the total environment*. 1992, vol. 111, p. 151 - 168.

Ebrahimi, M., Jafari, M., Savaghebi, Gh.R., Azarnivand, H., Tavili, A., Madrid, F. "Accumulation and distribution of metals in *Phragmites australis* (common reed) and *Scirpus maritimus* (alkali bulrush) in contaminated soils of Lia industrial area". *International journal of agricultural science, research and technology*. 2011, vol. 2, p. 73 - 81.

EEA - European Environment Agency - Progress in management of contaminated sites. 2012. Último acceso: 07-02-2016. Disponible en web: <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-inmanagement-of-contaminated-sites-3/assessment>.

Ellis, J.B., Shutes, R.B., Revitt, D.M., Zhang, T.T. "Use of macrophytes for pollution treatment in urban wetlands". *Resources, conservation and recycling*. 1994, vol. 11, p. 1-2.

EPA - Environmental Protection Agency. "Toxicological review of zinc and compounds". Washington, DC. 2005.

EPA - Environmental Protection Agency. 2003. "Technical standard operating procedure #EH-02 - Sediment sampling". Último acceso: 24-07-14. Disponible en web: http://www2.epa.gov/sites/production/files/documents/r8-src_eh-02.pdf.

EPA - Environmental Protection Agency. 2010. "Phytotechnology for site cleanup". Último acceso: 08-09-2014. Disponible en web: <http://nepis.epa.gov/>.

FAOSTAT - Organización de las Naciones Unidas para la alimentación y la agricultura. 2013. Último acceso: 14-08-2016. Disponible en web: <http://faostat3.fao.org/home/S>.

Fawzy, M.A., Badr, N.E., El-Khatib, A., Abo-El-Kassem, A. "Heavy metal biomonitoring and phytoremediation potentialities of aquatic macrophytes in River Nile". *Environmental monitoring and assessment*. 2012, vol. 184, p. 1753 - 1771.

Feng, X., Li, P., Qiu, G., Wang, S., 2007. "Human exposure to methylmercury through rice intake in mercury mining areas, Guizhou Province, China". *Environmental science technology*. 2007, vol. 42, p. 326-332.

Fernández Hernando, P., Martín-Esteban, A., Pérez-Conde, C., Vidal, M. *Toma y tratamiento de muestras*. España: Editorial Síntesis, S.A. 2002. ISBN: 9788477389620.

Fitzgerald, W.F., Lamborg, C.H. "Geochemistry of mercury in the environment". En: Sherwood Lollar, B., Holland, H.D., Turekian, K.K. (Eds.). *Treatise on Geochemistry*, Vol. 9. Oxford: Elsevier. 2007, p. 1-47.

Flora Ibérica. Centro Superior de Investigaciones Científicas. 2014. Último acceso: 22-04-14. Disponible en web: <http://www.floraiberica.org/>.

FOREGS - Forum of the European Geological Survey Directors. Geochemical Atlas of Europe. 2005. Último acceso: 09/02/2017. Disponible en web: <http://weppi.gtk.fi/publ/foregsatlas/article.php?id=15>.

- Fritioff, A., Kautsky, L., Greger, M. "Influence of temperature and salinity on heavy metal uptake by submersed plants". *Environmental pollution*. 2005, vol. 133, p. 265– 274.
- García Sansegudo, J., Álvarez Lorenzo, S., Martínez Rius, A., Verges Masip, J., Ortega Girones, E., Pascual Martínez, E. Mapa Geológico de España, E. 1:50.000. Almadén. [808 16-32]. Madrid, I.G.M.E. 1987.
- García, J., Lorenzo, S., Ortega, E. 1987. "Memoria del Mapa geológico de España, Hoja 808 – Almadén". Madrid: Servicio de publicaciones del Ministerio de Industria y Energía. 1987.
- García-Ordiales, E. "Incidences of mining in the Valdeazogues river basin and impact assessment in the aquatic system". Directores: Jorge Loredó Pérez, Pablo L. Higuera Higuera y Rocío Millán Gómez. Universidad de Oviedo, Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Minas de Oviedo. 2014a.
- García-Ordiales, E., Loredó, J. Esbrí, J.M., Lominchar, M.A., Millán, R., Higuera, P. "Stream bottom sediments as a means to assess metal contamination in the historic mining district of Almadén (Spain)". *International Journal of Mining, Reclamation and Environment*. 2014b, p. 1 – 20.
- Gentès, S., Monperrus, M. "Incidence of invasive macrophytes on methylmercury budget in temperate lakes: Central role of bacterial periphytic communities". *Environmental pollution*. 2013, vol. 172, p. 116–123.
- Gilbert, S.G. "A Small Dose of Toxicology: The Health Effects of Common Chemicals". 2ª Edición. Seattle: Healthy World Press. 2012.
- Gomes, M.V.T., de Souza, R.R., Teles, V. S., Mendes, E.A. "Phytoremediation of water contaminated with mercury using *Typha domingensis* in constructed wetland". *Chemosphere*. 2014, vol. 103, p. 228-233.
- Göthberg, A., Greger, M. "Formation of methyl mercury in an aquatic macrophyte". *Chemosphere*. 2006, vol. 65, p. 2096–2105.
- Gray, J.E., Crock, J.G., Fey, D.L. "Environmental geochemistry of abandoned mercury mines in west-central Nevada, USA". *Applied Geochemistry*. 2002, vol. 17, p. 1069–1079.
- Greenwood, N.N., Earnshaw, A. *Chemistry of the Elements*. 2ª Edición. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1997. ISBN: 0-7506-3365-4.
- Hadad, H.R., Mufarrege, M.M., Pincioli, M., Di Luca, G.A., Maine, M.A. "Morphological response of *Typha domingensis* to an industrial effluent containing heavy metals in a constructed wetland". *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 2010, vol. 58, p. 666-675.
- Hall, C.M., Higuera, P., Kesler, S.E., Lunar, R., Dong, H., Halliday, A.N. "Datación Ar39 / Ar40 de mineralizaciones de mercurio en el Sinclinal de Almadén". *Geogaceta*. 1996, vol. 20, n. 2, p. 483 - 486.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. *Free radicals in biology and medicine*. 3ª Edición. Nueva York: Oxford University Press. 1999.
- HEAST - Health Effects Assessment Summary Tables. 2014. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.
- Hegazy, A.K., Abdel-Ghani, N.T., El-Chaghaby, G.A. "Phytoremediation of industrial wastewater potentiality by *Typha domingensis*". *International journal of environmental science and technology*. 2011, vol. 8, p. 639–648.
- Hernández Sobrino, A. M. *Los mineros del Azogue*. 1ª Edición. Ciudad Real: Fundación Almadén. 2007.
- Hernández, A., Jébrak, M., Higuera, P., Oyarzun, R. Morata, D., Munhá, J. "The Almadén mercury mining district, Spain". *Mineralium Deposita*. 1999, vol. 34, p. 539 - 548.
- Hickman, J.C. (Ed.). *The Jepson manual: Higher plants of California*. Berkeley: University of California Press. 1993.
- Higuera, P., Oyarzun, R., Biester, H., Lillo, J., Lorenzo, S. "A first insight into mercury distribution and speciation in soils from the Almadén mining district, Spain". *Journal of Geochemical Exploration*. 2003, vol. 82, p. 95 - 104.
- Higuera, P., Oyarzun, R., Lillo, J., Sánchez-Hernández, J.C., Molina, J.A., Esbrí, J.M., Lorenzo, S. "The Almadén district (Spain): Anatomy of one of the world's largest Hg-contaminated sites". *Science of The Total Environment*. 2006, vol. 356, n. 1 – 3, p. 112 - 124.
- Higuera, P., Oyarzun, R., Lunar, R., Sierra, J., Parras, J. "The Las Cuevas mercury deposit, Almadén district

(Spain): Unusual case of deep-seated advanced argillic alteration related to mercury mineralization". *Mineralium Deposita*. 1999, vol. 34, p. 211 - 214.

Higueras, P., Oyarzun, R., Munhá, J., Morata, D. "Palaeozoic magmatic-related hydrothermal activity in the Almadén syncline (Spain): A long-lasting Silurian to Devonian process?". *Applied Earth Science IMM Transactions Section B*. 2000, vol. 109, p. 199-202.

Higueras, P., Oyarzun, R., Munhá, J., Morata, D. "The Almadén mercury metallogenic cluster (Ciudad Real, Spain): Alkaline magmatism leading to mineralization processes at an interplate tectonic setting". *Revista de la Sociedad Geológica de España*. 2000, vol. 13, n. 1, p. 105-119.

Hildebrand, S.G., Huckabee, J.W., Sanz Diaz, F., Janzen, S.A., Solomon, J.A., Kumar, K.D. *Distribution of Mercury in the Environment at Almadén, Spain (ORNL/TM-7446)*. Oak Ridge: Oak Ridge National Laboratory. 1980.

Hintelmann, H., Nguyen, H.T. "Extraction of methylmercury from tissue and plant samples by acid leaching". *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2005, vol. 381, p. 360-365.

Horvat, M., Nolde, N., Fajon, V., Jereb, V., Logar, M., Lojen, S., Jacimovic, R., Falnoga, I., Liya, Q., Faganeli, J., Drobne, D. "Total mercury, methylmercury and selenium in mercury polluted areas in the province Guizhou, China". *Science of the total environment*. 2003, vol. 304, p. 231-256.

Hursh, J.B., Clarkson, T.W., Miles, E.F., Goldsmith, L.A. "Percutaneous absorption of mercury vapor by man". *Archives of Environmental Health*. 1989, vol. 44, p. 120 - 127.

IARC - International Agency for Research on Cancer. "Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 87: Inorganic and Organic Lead Compounds". 2006. Último acceso: 26-09-2014. Disponible en web: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol87/>.

IGME. Atlas geoquímico de España. 1ª Edición. Madrid: Instituto geológico minero. 2012. ISBN: 978-84-7840-875-7.

IGME. Mapa Geológico de España: E. 1:50.000 Almadén. Ministerio de Industria y Energía, Servicio de Publicaciones. Madrid. 1987.

IGN - Instituto geográfico nacional. Plan Nacional de Ortofotografía Aérea de España. Cartografía del Instituto Geográfico Nacional. 2007.

IRIS - Integrated Risk Information System. 2014. Último acceso: 09-2014. Disponible en web: <http://www.epa.gov/iris/>.

Jiménez Moreno, M. "Desarrollo de métodos analíticos para especiación de mercurio y su aplicación a la comarca de Almadén". Directores: Juan José Berzas Nevado y Rosa del Carmen Rodríguez Martín-Doimeadios. Universidad de Castilla-La Mancha, Facultad de Ciencias del Medio Ambiente. 2009.

Jones, J.B., Jr. "Plant tissue analysis in micronutrients". En Mortvedt, J.J., Giordano, P.M., Lindsay, W.L. (eds.). *Micronutrients in agriculture*. Madison: Soil Science Society of America Book Series. 1972, p. 477 - 522.

Kabata-Pendias, A. *Trace elements in the soils and plants*, Fourth Edition. Boca Raton: CRC Press. 2011

Kaifer, M. J., Aguilar, A., Arana, A., Balseiro, C., Torá, I., Caleyá, J. M. Pijls, C. 2004. *Guía de Tecnologías de Recuperación de Suelos Contaminados*. Madrid: Comunidad de Madrid - Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio. 175 pp.

Kamal, M., Ghaly, A.E., Mahmoud, N., Côté, R. 2004. "Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants". *Environmental international*. 2004, vol. 29, p. 1029 - 1039.

King, J.K., Harmon, S.M., Fu, T.T., Gladden, J.B. "Mercury removal, methylmercury formation, and sulfate-reducing bacteria profiles in wetland mesocosms". *Chemosphere*. 2002, vol. 46, p. 859-870.

Klink, A., Maciol, A., Wislocka, M., Krawczyk, J. "Metal accumulation and distribution in the organs of *Typha latifolia* L. (cattail) and their potential use in bioindication". *Limnologica*. 2013, vol. 43, p. 164 - 168.

Lasat, M.M. "Phytoextraction of metals from contaminated soil: a review of plant/soil/metal interaction

- and assessment of pertinent agronomic issues”. *Journal of Hazardous Substance Research*. 2000, vol. 2, n. 5, p. 1-25.
- Lázaro, J. “Fitocorrección de suelos contaminados con metales pesados: Evaluación de plantas tolerantes y optimización del proceso mediante prácticas agronómicas”. Directores: María del Carmen Monterroso Martínez y Petra S. Kidd. 2008. Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela. Departamento de Edafología y Química Agrícola. Santiago de Compostela.
- Leermakers, M., Baeyens, W., Quevauviller, P., Horvat, M. “Mercury in environmental samples: Speciation, artifacts and validation”. *Trends in Analytical Chemistry*. 2005, vol. 24, n. 5, vol. 383 – 393.
- Levine, S.P., Cavender, G.D., Langolf, G.D., Albers, J.W. “Elemental mercury exposure: Peripheral neurotoxicity”. *British Journal of Industrial Medicine*. 1982, vol. 39, p. 136 - 139.
- Li, L., Wang, F., Meng, Bo, Lemes, M., Feng, X., Jiang, G. “Speciation of methylmercury in rice grown from a mercury mining area”. *Environmental Pollution*. 2010, vol. 158, p. 3103 – 3107.
- Li, P., Feng, X., Qiu, G., Shang, L., Wang, S., 2008. “Mercury exposure in the population from Wuchuan mercury mining area, Guizhou, China”. *Science of the total environment*. 2008., vol. 395, p. 72–79.
- Li, P., Feng, X., Yuan, X., Chan, H.M., Qiu, G., Sun, G.-X., Zhu, Y.G. “Rice consumption contributes to low level methylmercury exposure in southern China”. *Environment international*. 2012, vol. 49, p. 18–23.
- Lin, L., Chang, L., Jiang, S. “Speciation analysis of mercury in cereals by liquid chromatography chemical vapor generation inductively coupled plasma-mass spectrometry”. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008, vol. 56, p. 6868–6872.
- Lorenzo, R.A., Vázquez, M.J., Carro, A.M., Cela, R. “Methylmercury extraction from aquatic sediments, a comparison between manual, supercritical fluid and microwave-assisted techniques”. *Trends in Analytical Chemistry*. 1999, vol. 18, p. 410 - 416.
- Lozano-Rodríguez, E., Luguera, M., Lucena, J.J., Carpena-Ruiz, R.O. “Evaluation of two different acid digestion methods in closed systems to trace element determination in plants”. *Química Analítica*. 1995, vol. 14, p. 27 - 30.
- Madhava Rao, K. V., Sresty, T. V. S. “Antioxidative parameters in the seedlings of pigeon-pea (*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses”. *Plant Science*. 2000, vol. 157, p. 113 - 128.
- Maier, E.A., Griepink, B., Quevauviller, P. *Quality Assurance for Environmental Analysis: Method Evaluation within the Measurements and Testing Programme*. Amsterdam: Elsevier ed. 1995.
- Mailman, M., Bodaly, R.A. “Total mercury, methyl mercury, and carbon in fresh and burned plants and soil in Northwestern Ontario”. *Environmental pollution*. 2005, vol. 138, p. 161–6.
- Marchand, L., Mench, M., Jacob, D. L., Otte, M. L. “Metal and metalloid removal in constructed wetlands, with emphasis on the importance of plants and standardized measurements: A review”. *Environmental pollution*. 2010, vol. 158, p. 3447 - 3461.
- Markert, B., Wappelhost, O., Weckert, V., Herpin, U., Siewers, U., Friese, K., Breulmann, G. “The use of bioindicators for monitoring the heavy-metal status of the environment”. *Journal of radioanalytical and nuclear chemistry*. 1999, vol. 240, p. 425–429.
- Marvin-DiPasquale, M., Windham-Myers, L., Agee, J.L., Kakouros, E., Kieu, L.H., Fleck, J.A., Alpers, C.N., Stricker, C.A. “Methylmercury production in sediment from agricultural and non-agricultural wetlands in the Yolo Bypass, California, USA”. *Science of the Total Environment*. 2014, vol. 484, p. 288-299.
- Massa, N., Andreucci, F., Poli, M., Aceto, M., Barbato, R., Berta, G. “Screening for heavy metal accumulators amongst autochthonous plants in a polluted site in Italy”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2010, vol. 73, p. 1988 - 1997.
- Matilla Tascón, A. *Historia de las minas de Almadén. Vol. I: Desde la época romana hasta el año 1645*. España: Ed. Lozano Comunicación gráfica. 2005.

- Mays, P.A., Edwards, G.S. "Comparison of heavy metal accumulation in a natural wetland and constructed wetlands receiving acid mine drainage". *Ecological Engineering*. 2001, vol. 16, p. 487 – 500.
- Mazej, Z., Germ, M. "Trace element accumulation and distribution in four aquatic macrophytes". *Chemosphere*. 2009, vol. 79, p. 642 – 647.
- Meng, B., Feng, X., Qiu, G., Cai, Y., Wang, D., Li, P., Shang, L., Sommar, J. "Distribution patterns of inorganic mercury and methylmercury in tissues of rice (*Oryza sativa* L.) plants and possible bioaccumulation pathways". *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010, vol. 58, p. 4951–4958.
- Meng, M., Li, B., Shao, J., Wang, T., He, B., Shi, J., Ye, Z., Jiang, G. "Accumulation of total mercury and methylmercury in rice plants collected from different mining areas in China". *Environmental pollution*. 2014, vol. 184, p. 179–86.
- Mganga, N., Manoko, M.L.K., Rulangeranga, Z.K. "Classification of plants according to their heavy metal content around North Mara gold mine, Tanzania: Implication for phytoremediation". *Tanzania journal of science*. 2011, vol. 37, p. 109 – 119.
- Miale, J.B. *Hematología: Medicina de laboratorio*. Barcelona: Editorial Reverté. 1985.
- Millán, R., Gamarra, R., Schmid, T., Sierra, M.J., Quejido, A.J., Sánchez, D.M., Cardona, A.I., Fernández, M., Vera, R. "Mercury content in vegetation and soils of the Almadén mining area (Spain)". *Science of Total Environment*. 2006, vol. 368, n. 1, p. 79 - 87.
- Millán, R., Lominchar, M.A., López-Tejedor, I., Rodríguez-Alonso, J., Schmid, T., Sierra, M.J. "Behaviour of mercury in soils from the Valdeazogues riverbank and transfer to *Nerium oleander* L". *Journal of Geochemical Exploration*. 2012, vol. 123, p. 136 - 142.
- Millán, R., Lominchar, M.A., Rodríguez-Alonso, J., Schmid, T., Sierra, M.J. "Riparian vegetation role in mercury uptake (Valdeazogues River, Almadén, Spain)". *Journal of Geochemical Exploration*. 2014, vol. 104, p. 104 - 110.
- Millán, R., Sierra, M.J., Schmid, T., Carrasco Gil, S., Sánchez Ledesma, D.M., Díaz Puente, F.J. "Mercury distribution in an abandoned metallurgical plant". *E3S Web of Conferences*. 2013, vol. 1.
- Molina, C.I., Gibon, F., Duprey, J., Domínguez, E., Guimarães, J.D., Roulet, M. "Transfer of mercury and methylmercury along macroinvertebrate food chains in a floodplain lake of the Beni River, Bolivian Amazonia". *Science of the total environment*. 2010, vol. 408, p. 3382-3391.
- Molina, J.A., Oyarzun, R., Esbrí, J.M., Higuera, P. "Mercury accumulation in soils and plants in the Almadén mining district, Spain: one of the most contaminated sites on Earth". *Environmental Geochemistry and Health*. 2006, vol. 28, p. 487 – 498.
- Monperrus, M., Tessier, E., Amouroux, D., Leynaert, A., Huonnic, P., Donard, O.F.X. "Mercury methylation, demethylation and reduction rates in coastal and marine surface waters of the Mediterranean Sea". *Marine Chemistry*. 2007, vol. 107, p. 49–63.
- Monperrus, M., Tessier, E., Veschambre, S., Amouroux, D., Donard, O. "Simultaneous speciation of mercury and butyltin compounds in natural waters and snow by propylation and species-specific isotope dilution mass spectrometry analysis". *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2005, vol. 381, p. 854–862.
- Moore, T.R., Bubier, J.L., Heyes, A., Flett, R.J. "Methyl and total mercury in boreal wetland plants, experimental lakes area, Northwestern Ontario". *Journal of environmental quality*. 1995, vol. 24, p. 845 – 850.
- Muhammad, I., Puschenreiter, M., Wenzel, W.W. "Cadmium and Zn availability as affected by pH manipulation and its assessment by soil extraction, DGT and indicator plants". *Science of the total environment*. 2012, vol. 416, p. 490 – 500.
- Mulligan, C.N., Yong, R.N., Gibbs, B.F. "Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation". *Engineering Geology*. 2001, vol. 60, p. 193 – 207.
- Murphy, C., Cooper, D. "The Evolution of Horizontal Subsurface Flow Reed Bed Design for Tertiary Treatment of Sewage Effluents in the UK". En: Jan Vymazal (ed.). *Water and Nutrient Management in Natural and Constructed Wetlands*. Springer, 2010. pp 103 – 119.

- Neustadt, J., Pieczenik, S. 2007. Heavy-Metal Toxicity—With Emphasis on Mercury. *Integrative Medicine* 6 (2), 26 – 32.
- Nieves, M., Gómez-Miguel, V. “Edafología” Atlas Nacional de España. Sección II. Grupo 7. 1992.
- Nollet, L.M.L. *Chromatographic Analysis of the Environment*, Third Edition. Boca Raton: CRC Press. 2006.
- Nriagu, J.O. “Global inventory of natural and anthropogenic emission of trace metals to the atmosphere”. *Nature*. 1979, vol. 279, p. 409 - 411.
- OMS – Organización Mundial de la Salud. *Intoxicación por plomo y salud*. Nota descriptiva N° 379. 2013.
- Oorts, K. “Copper”. En: Alloway, B.J. (ed.) *Heavy metals in soils: Trace metals and metalloids in soils and their bioavailability*, Third Edition. Springer. 2013.
- Ortiz Bernad, I., Sanz García, J., Dorado Valiño, M., Villar Fernández, S. *Técnicas de recuperación de suelos contaminados*. Informe de vigilancia tecnológica. España. 2007.
- Otten, J.J., Hellwig, J.P., Meyers, L.D. *Dietary Reference Intakes: The Essential Guide to Nutrient Requirements*. Washington: National Academies Press. 2006.
- Outridge, P.M., Noller, B.N. “Accumulation of toxic trace elements by freshwater vascular plants”. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. 1991, vol. 121, p. 1-63.
- Palero-Fernández, F.J., Martín-Izard, A., Prieto, M.Z., Mansilla-Plaza, L. “Geological context and plumbotectonic evolution of the giant Almadén Mercury Deposit”. *Ore Geology Reviews*. 2015, vol. 64, p. 71 - 78.
- Pandey, V.C., Singh, N., Singh, R.P., Singh, D.P. “Rhizoremediation potential of spontaneously grown *Typha latifolia* on fly ash basins: Study from the field”. *Ecological engineering*. 2014, vol. 71, p. 722 – 727.
- Parys, E., Romanowska, E., Siedlecka, M., Poskuta, J.W. “The effect of lead on photosynthesis and respiration in detached leaves and in mesophyll protoplasts of *Pisum sativum*”. *Acta Physiologiae Plantarum*. 1998, vol. 20, p. 313 – 322.
- Patra, M., Sharma, A. “Mercury toxicity in plants”. *Botanical Review*. 2000, vol. 66, p. 379 – 422.
- Pawliszyn, J. *Applications of Solid Phase Microextraction*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry. 1999.
- Peakall, D., Burger, J. “Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors”. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2003, vol. 56, p. 110 - 121.
- Peña, D. *Regresión y diseño de experimentos*. Madrid: Alianza Editorial. 2002.
- Peñalver Hernando, A.J. “Aplicación de la microextracción en fase sólida al análisis medioambiental”. Directores: Rosa M. Marcé y Eva Pocurull. Universitat Rovira i Virgili. Tarragona. 2002.
- Pilon-Smits, E. “Phytoremediation”. *Annual Review of Plant Biology*. 2005, vol. 56, p. 15 - 39.
- Popova, T.V., Aksenova, N.V. “Complexes of copper in unstable oxidation states”. *Russian journal of coordination chemistry*. 2003, vol. 29, n. 11, p. 743 - 765.
- Porta, J., López-Acevedo, M., Roquero, C. *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. 2ª edición. España: Ediciones Mundi-Prensa. 1999.
- Pourrut, B., Shahid, M., Dumat, C., Winterton, P., Pinelli, E. “Lead uptake, toxicity, and detoxification in plants”. *Reviews of environmental contamination and toxicology*. 2011, vol. 213, p. 113 – 136.
- Qiu, G., Feng, X., Li, P., Wang, S. “Methylmercury accumulation in rice (*Oryza sativa* L.) grown at abandoned mercury mines in Guizhou, China”. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2008, vol. 56, p. 2465–2468.
- Quevauviller, P., Rauret, G., López-Sánchez, J.F., Rubio, R. Ure, A. Muntau, H. “Certification of trace metal extractable contents in a sediment reference material (CRM 061) following a three-step sequential extraction procedure”. *Science of The Total Environment*. 1997, vol. 205, n. 2, p. 223 - 234.
- Rai, P.K. “Heavy Metal Pollution in Aquatic Ecosystems and its Phytoremediation using Wetland Plants: An ecosustainable approach”. *International Journal of Phytoremediation*. 2008, vol. 10, p. 133 - 160.
- RAIS – The Risk Assessment Information System. www.rais.ornl.gov. (Último acceso 08-07-2014).

- Ralston, N.V.C., Raymond, L. J. "Dietary selenium's protective effects against methylmercury toxicity". *Toxicology*. 2010, vol. 278, p. 112 – 123.
- Ramalhosa, E.C.D., Río-Segade, S. "Analytical methods for mercury speciation in several matrixes: A review". *Trends in chromatography*. 2008, vol. 4, p. 43 - 77.
- Ramos Miras, J.J. "Estudio de la contaminación por metales pesados y otros procesos de degradación química en los suelos en los invernaderos del poniente almeriense". Directores: Carlos Gil de Carrasco y Rafael Boluda Hernández. Universidad de Almería. 2002.
- Rascioa, N., Navari-Izzo, F. "Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting?". *Plant Science*. 2011, vol. 180, p. 169 – 181.
- Reddy, K. R., Admas, J. F., Richardson, C. "Potential technologies for remediation of Brownfield". *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*. 1999, vol. 3, n. 2, p. 61 - 68.
- Reddy, K. R., DeLaune, R. D. *Biogeochemistry of wetlands: Science and applications*. Boca Raton: CRC. 2008.
- Regier, N., Frey, B., Converse, B., Roden, E., Grosse-Honebrink, A., Bravo, A.G., Cosio, C. "Effect of *Elodea nuttallii* roots on bacterial communities and MMHg proportion in a Hg polluted sediment". *PLoS One*. 2012, vol. 7, n. 9, e45565.
- Regier, N., Larras, F., Bravo, A.G., Ungureanu, V.-G., Amouroux, D., Cosio, C. "Mercury bioaccumulation in the aquatic plant *Elodea nuttallii* in the field and in microcosm: accumulation in shoots from the water might involve copper transporters". *Chemosphere*. 2013, vol. 90, p. 595–602.
- Rieber, M., Harris, D.P. 1994. Mercury pollution: The impact of U. S. government stockpile releases. En: Watras C.J., Huckabee J.W., eds. *Mercury pollution integration and synthesis*. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 615-620.
- Risher, J.F., Murray, H.E., Prince, G.R. "Organic mercury compounds: human exposure and its relevance to public health". *Toxicology and Industrial Health*. 2002, vol. 18, n. 3, p. 109 - 160.
- Rivas Martínez, S. *Memoria del mapa de series de vegetación de España 1: 400.000*. Madrid: Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. 1987.
- Rout, G.R., Das, P. "Effect of Metal Toxicity on Plant Growth and Metabolism: I. Zinc". *Agronomie*. 2003, vol. 23, n. 1, p. 3-11.
- Sánchez, D.M., Quejido, A.J., Fernández, M., Hernández, C., Schmid, T., Millán, R. González, M., Aldea, M., Martín, R., Morante, R. "Mercury and trace element fractionation in Almadén soils by application of different sequential extraction procedures". *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2005, vol. 381, p. 1507 – 1513.
- Sanei, H., Outridge, P.M., Stern, G.A., Macdonald, R.W. "Classification of mercury-labile organic matter relationships in lake sediments". *Chemical geology*. 2014, vol. 373, p. 87 – 92.
- Sasmaz, A., Obek, E., Hasar, H. "The accumulation of heavy metals in *Typha latifolia* L. grown in a stream carrying secondary effluent". *Ecological engineering*. 2008, vol. 33, p. 278 – 284.
- Schmidt, L., Bizzi, C.A., Duarte, F.A., Dressler, V.L., Flores, E.M.M. "Evaluation of drying conditions of fish tissues for inorganic mercury and methylmercury speciation analysis". *Microchemical Journal*. 2013, vol. 108, p. 53 - 59.
- Schoeneberger, P.J., D.A. Wysocki, E.C. Benham, and Soil Survey Staff. *Field book for describing and sampling soils, Version 3.0*. Nebraska: Natural Resources Conservation Service. 2012.
- Schwesig, D., Krebs, O. The role of ground vegetation in the uptake of mercury and methylmercury in a forest ecosystem. *Plant and soil*. 2003, vol. 253, p. 445–455.
- Scott, R.P.W. *Introduction to Analytical Gas Chromatography*, Second Edition. New York: CRC Press. 1998
- Setia, R.C., Bala, R. "Anatomical changes in root and stem of wheat (*Triticum aestivum* L.) in response to different heavy metals". *Phytomorphology*. 1994, vol. 44, p. 95-104.
- Shao, Y., Jiang, L., Zhang, D., Ma, L., Li, C. "Effects of arsenic, cadmium and lead on growth and respiratory

- enzymes activity in wheat seedlings". *African Journal of Agricultural Research*. 2011, vol. 6, p. 4505 - 4512.
- Sharma, P., Dubey, R.S. "Lead toxicity in plants". *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 2005, vol. 17, p. 35 - 52.
- Sharpe, A.G. *Química inorgánica*. España: Reverté. 1993.
- Shaw, B.P., Sahu, S.K., Mishra, R.K. "Heavy metal induced oxidative damaged in terrestrial plants". En: Prasad M.N.V. (ed.) *Heavy metal stress in plants, Second edition*. Berlin: Springer. 2004, p. 84 – 126.
- Sherwood Lollar, B. *Environmental Geochemistry*. The Netherlands: Elsevier. 2005.
- Shi, J., Liang, L., Jiang, G. "Simultaneous determination of methylmercury and ethylmercury in rice by capillary gas chromatography coupled on-line with atomic fluorescence spectrometry". *Journal of AOAC International*. 2005, vol. 88, n. 2, p. 665 – 669.
- Shikanai, t., Müller-Moulé, P., Munekage, Y., Niyogi, K.K., Pilon, M. "PAA1, a P-type ATPase of Arabidopsis, functions in copper transport in chloroplasts". *The plant cell*. 2003, vol. 15, n. 6, p. 1333-1346.
- SIGA – Sistema de Información Geográfico Agrario. 2014. Último acceso: 02/07/2014. Disponible en: <http://www.sig.magrama.es/siga/>.
- Sin, Y.M., Lim, Y.F., Wong, M.K. "Uptake and distribution of mercury in mice from ingesting soluble and insoluble mercury compounds". *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 1983, vol. 31, n. 5, p. 605 - 612.
- Singh, R., Tripathi, R.D., Dwivedi, S., Kumar, A., Trivedi, P.K., Chakrabarty, D. "Lead bioaccumulation potential of an aquatic macrophyte *Najas indica* are related to antioxidant system". *Bioresource Technology*. 2010, vol. 101, p. 3025 – 3032.
- Skinner, K., Wright, N., Porter-Goff, E. "Mercury uptake and accumulation by four species of aquatic plants". *Environmental pollution*. 2007, vol. 145, p. 234 - 237.
- Sobhaniana, H., Aghaeib, K., Komatsu, S. "Changes in the plant proteome resulting from salt stress: Toward the creation of salt-tolerant crops?". *Journal of proteomics*. 2011, vol. 74, p. 1323 – 1337.
- Sobolewski, A. "A Review of Processes Responsible for Metal Removal in Wetlands Treating Contaminated Mine Drainage". *International journal of phytoremediation*. 1999, vol. 1, n. 1, p. 19 – 51.
- Suedel, B.C., Nicholson, A., Day, C.H., Spicer, J. "The value of metals bioavailability and speciation information for ecological risk assessment in arid soils". *Integrated Environmental Assesment and Management*. 2006, vol. 2, n. 4, p. 355 - 364.
- Sundberg-Jones, S.E., Hassan, S.M. "Macrophyte sorption and bioconcentration of elements in a pilot constructed wetland for flue gas desulfurization wastewater treatment". *Water Air and Soil Pollution*. 2007, vol. 183, p. 187 – 200.
- Szymanowska, A., Samecka-Cymerman, A. Kempers, A.J. "Heavy metals in three lakes in west Poland. *Ecotoxicology and environmental safety*". 1999, vol. 43, p. 21–29.
- Tessier, A., Cambell, P.G.C, Bisson, M. "Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals". *Analytical Chemistry*. 1979, vol. 51, p. 844 – 851.
- Thurmond, D.L. *From vines to wines in classical Rome: A Handbook of viticulture and oenology in Rome and the Roman West*. Boston: Brill. 2016.
- Tiller, K.G. "Heavy metals in soils and their environmental significance". En: Stewart, B.A. (Ed.) *Advances in soil Science*. New York: Springer. 1989.
- Tsonev, T., Lidon, F.C. "Zinc in plants - An overview". *Emirates Journal of Food and Agriculture*. 2012, vol. 24, p. 322 – 333.
- USDA - Soil Survey Division Staff. Keys to Soil Taxonomy. Washington DC: Natural Resources Conservation Service. 2014.
- USDA - Soil Survey Division Staff. Soil survey manual. Washington DC: Soil Conservation Service. 1993.

- Van Assche, F., Clijsters, H. "Effects of metal on enzyme activity in plants". *Plant, Cell and Environment*. 1990, vol. 13, p. 195 - 206.
- Van der Ent, A., Baker, A.J.M., Reeves, R.D., Pollard, A.J. Schat, H. "Hyperaccumulators of metal and metalloid trace elements: Facts and fiction". *Plant and Soil*. 2012, vol. 362, n. 1, p. 319-334.
- Veselý, T., Tlustoš, P., Száková, J. "Organic acid enhanced soil risk element (Cd, Pb and Zn) leaching and secondary bioconcentration in Water Lettuce (*Pistia Stratiotes L.*) in the rhizofiltration process". *International journal of phytoremediation*. 2011, vol. 14, p. 335 - 349.
- Vymazal, J., Švehla, J., Kröpfelová, L., Chrastný, V. "Trace metals in *Phragmites australis* and *Phalaris arundinacea* growing in constructed and natural wetlands". *Science of the total environment*. 2007, vol. 380, p. 154 - 162.
- Vroom, F.Q., Greer, M. "Mercury vapor intoxication". *Brain*. 1972, vol. 95, p. 305 - 318.
- Warren, C. *Brush with Death: A Social History of Lead Poisoning*. Maryland: Johns Hopkins University Press. 2000.
- Westöo, G. 1966. "Determination of methylmercury compounds in foodstuff". *Acta Chemica Scandinavica*. 1966, vol. 20, p. 2131 - 2137.
- WHO - World Health Criteria - Environmental Health Criteria 118: Mercury. 1991. Último acceso: 08-12-2016. Disponible en: <http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc118.htm>.
- WHO - World Health Criteria - Environmental Health Criteria 221: Zinc. 2001. Último acceso: 18-09-2014. Disponible en: http://www.who.int/ipcs/publications/ehc/ehc_221/en.
- Willis, J.M., Gambrell, R.P., Hester, M.W. "Growth response and tissue accumulation trends of herbaceous wetland plants species exposed to elevated aqueous mercury levels". *International Journal of Phytoremediation*. 2010, vol. 12, p. 586 - 598.
- Wittig, R. "General aspects of biomonitoring heavy metals by plants". En: Markert, B. (Ed.), *Plants as biomonitors/ indicator for heavy metals in the terrestrial environment*. Weinheim: VCH Publisher. 1993, p. 3-28.
- Wuana, R.A., Okieimen, F.E. "Heavy Metals in Contaminated Soils: A Review of Sources, Chemistry, Risks and Best Available Strategies for Remediation". *ISRN Ecology*. 2011.
- Yang, J., Ye, Z. "Metal accumulation and tolerance in wetland plant". *Frontiers of biology in China*. 2009, vol. 4, p. 282-288.
- Ye, Z.H., Baker, A.J.M., Wong, M.H., Willis, A.J. "Copper tolerance, uptake and accumulation by *Phragmites australis*". *Chemosphere*. 2003, vol. 50, p. 795 - 800.
- Ye, Z.H., Baker, A.J.M., Wong, M.H., Willis, A.J. "Zinc, lead and cadmium tolerance, uptake and accumulation by *Typha latifolia*". *New Phytologist*. 1997, vol. 136, p. 469-480.
- Yoon, J., Cao, X., Zhou, Q., Ma, L.Q. "Accumulation of Pb, Cu, and Zn in native plants growing on a contaminated Florida site". *Science of the total environment*. 2006, vol. 368, p. 456 - 464.
- Yruela, I. "Copper in plants". *Brazilian Journal of Plant Physiology*. 2005, vol. 17, p. 145 - 156.
- Zeng, F., Ali, S., Zhang, H., Ouyang, Y., Qiu, B., Wu, F. Zhang, G. "The influence of pH and organic matter content in paddy soil on heavy metal availability and their uptake by rice plants". *Environmental pollution*. 2011, vol. 159, p. 84 - 91.
- Zhang, H., Feng, X., Larssen, T. "Bioaccumulation of methylmercury versus inorganic mercury in rice (*Oryza sativa L.*) grain". *Environmental sciences*. 2010, vol. 44, p. 4499-4504.
- Zhao, S., Feng, C., Wang, D., Liu, Y., Shen, Z. "Salinity increases the mobility of Cd, Cu, Mn, and Pb in the sediments of Yangtze Estuary: Relative role of sediments' properties and metal speciation". *Chemosphere*. 2013, vol. 91, p. 977 - 984.

ANEXOS

ANEXO I:

Etapas de la Extracción Secuencial SEP CIEMAT
(Sánchez et al., 2005)

Etapas 1

Pesar 0,5 g de la muestra de suelo bulk (con un tamaño inferior a 2 mm) secada al aire y colocarla en un tubo de centrifuga de plástico con tapón de rosca con 25 ml de H₂O milli-Q. A continuación:

- 1 hora de agitación orbital a T^a ambiente.
- 15 minutos de centrifugación a 10.000 rpm.
- Filtrar 0,45 µm.
- Acidular con HNO₃ suprapur (0.1 ml).
- Guarda en nevera.

Etapas 2

Se toma el residuo de la Etapa 1 y se añade 20 ml de NH₄Cl 1 M (pH=7) con pipeta. Seguidamente:

- 1 hora de agitación orbital a T^a ambiente.
- 15 minutos de centrifugación a 10.000 rpm.
- Filtrar 45 µm sobre un matraz aforado de 25 ml.
- Lavar el residuo con 3 ml de H₂O de milli-Q.
- 10 min de centrifugación a 10.000 rpm.
- Filtrar lavado 45 µm y reunir con filtrado anterior.
- Acidular con HNO₃ suprapur (0,5 ml).
- Aforar a 25 ml con H₂O milli-Q y guardar en nevera.

Etapas 3

Se toma el residuo de la Etapa 2 y se añade 20 ml de solución Morgan (NH₄AC 1M pH= 4,5). A continuación:

- 4 horas a 85 °C en baño de agua.
- 15 min de centrifugación a 10.000 rpm.
- Filtrar lavado 45 µm y reunir con filtrado anterior.
- Acidular con HNO₃ suprapur (0,5 ml).
- Aforar a 25 ml con H₂O milli-Q y guardar en nevera.

Etapas 4

Se toma el residuo de la Etapa 3 y se añade 20 ml de solución Tamn (5.45 g L⁻¹ de ácido oxálico+ 8.05 g L⁻¹ de oxalato amónico pH=2,8). A continuación:

- 4 horas de agitación orbital (los tubos deben estar protegidos de la luz con papel aluminio).
- 15 min de centrifugación a 10.000 rpm.
- Filtrar lavado 45 µm y reunir con filtrado anterior.
- Acidular con HNO₃ suprapur (0,5 ml).
- Aforar a 25 ml con H₂O milli-Q y guardar en nevera.

Etapas 5

Se toma el residuo de la Etapa 4 y se añade 30 ml de HCl 6 M. Seguidamente:

- 2 horas a 85 °C en baño de agua y agitación manual ocasional.
- 15 min centrifugación a 10.000 rpm.
- Filtrar 0,45 µm sobre matraz aforado de 100 ml.
- Lavar el residuo con 3 ml de H₂O milli-Q.
- 10 min de centrifugación.
- Filtrar lavado 0,45 µm y reunir con filtrado anterior.
- Aforar con H₂O milli-Q.
- Guardar tanto filtrado como el residuo en nevera.

Etapas 6

Se toma el residuo de la Etapa 5 y se añade 5 ml de H₂O₂. A continuación:

- Se deja 1 hora agitando manualmente de forma ocasional y cada 15 min se introduce en un baño de ultrasonido.
- Se introduce 1 hora en baño de agua a 85 °C destapados para bajar el volumen.
- Se añaden otro 5 ml de H₂O₂ y se deja 1 hora a 85 °C con el tapón superpuesto.
- Después 2 horas más a 85 °C destapados para reducir volumen.
- Se añaden 25 ml de NH₄Ac 1 M pH=2 y se deja toda la noche en agitación orbital.
- Centrifugar 15 min a 10.000 rpm.
- Filtrar 0,45 µm sobre matraz aforado de 50 ml.
- Lavar el residuo con 3 ml de H₂O milli-Q y centrifugar 10 min.
- Filtrar 0,45 µm y reunir con filtrado anterior.
- Aforar con H₂O milli-Q.
- Guardar en nevera.

Etapas 7

Se toma el residuo de la Etapa 6 y se añaden 5 ml de HF concentrado, se agita bien y se deja toda la noche. Al día siguiente se le añaden 5 ml de HNO₃ y 5 ml de HCl, y se introducen en reactores y se les somete a un ataque con microondas. Transcurrido un día se filtra 0,45 µm y se afora a 50 ml en matraces de plástico. Por último la muestra se guarda en nevera.

ANEXO II - Valores de concentración de los CRMs utilizados

CRM	Valor certificado (mg kg ⁻¹)			
	Hg	Pb	Cu	Zn
BCR-060	0,34 ± 0,04	64 ± 4	51,2 ± 1,9	313 ± 8
BCR-062	0,28 ± 0,0196	25 ± 1,5	46,6 ± 1,81	16,0 ± 0,704
CRM020-050	1,12 ± 0,03	5110 ± 50,8	729 ± 5,57	3010 ± 22,3
CRM051-050	4,08 ± 0,099	181 ± 3,60	327 ± 5,21	44 ± 5,61
NCS ZC73013	0,020 ± 0,003	11,1 ± 0,9	8,9 ± 0,4	35,3 ± 1,5
SRM 1573a	0,034 ± 0,004	-	4,70 ± 0,14	30,9 ± 0,7
SRM 2709	1,40 ± 0,08	18,9 ± 0,5	34,6 ± 0,7	106 ± 3

ANEXO III - Tablas resumen de datos

1. Valores fisicoquímicos en sedimento y concentraciones soluble, intercambiable, disponible y total de metales pesados en cada uno de los puntos de muestreo.

	Parámetro	VZ - 0		
		2010	2011	2013
	pH – H ₂ O (1:2,5)	6,27	6,53	6,78
	CE (1:5) (μS cm ⁻¹)	93,45	75,05	60,75
	CEe (dS cm ⁻¹)	0,598	0,480	0,389
	MO (%)	1,00	0,32	0,77
Soluble	Hg (mg kg ⁻¹)	0,010 ± 0,000	0,001 ± 0,000	0,004 ± 0,000
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	< LD	0,51 ± 0,07	<LD
	Cu (mg kg ⁻¹)	< LD	<LD	<LD
Intercambiable	Hg (mg kg ⁻¹)	0,020 ± 0,004	0,035 ± 0,008	0,007 ± 0,002
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	< LD	<LD	0,01 ± 0,001
	Cu (mg kg ⁻¹)	< LD	<LD	<LD
Disponible	Hg (mg kg ⁻¹)	0,030 ± 0,004	0,035 ± 0,008	0,026 ± 0,003
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	<LD	0,51 ± 0,07	0,01 ± 0,001
	Cu (mg kg ⁻¹)	< LD	<LD	<LD
Total	Hg (mg kg ⁻¹)	0,77 ± 0,10	0,99 ± 0,13	6,2 ± 1,1
	Pb (mg kg ⁻¹)	53,8 ± 8,9	28,7 ± 7,1	23,1 ± 4,4
	Zn (mg kg ⁻¹)	95,6 ± 2,4	99,3 ± 0,5	109,2 ± 2,0
	Cu (mg kg ⁻¹)	45,5 ± 6,3	37,6 ± 0,6	22,8 ± 2,5

	Parámetro	VZ-1		
		2010	2011	2013
	pH – H ₂ O (1:2,5)	ND	6,07	5,1
	CE (1:5) (μS cm ⁻¹)	ND	460	833,5
	CEe (dS cm ⁻¹)	ND	2,94	5,33
	MO (%)	ND	2,17	3,54
Soluble	Hg (mg kg ⁻¹)	ND	0,006 ± 0,001	0,005 ± 0,001
	Pb (mg kg ⁻¹)	ND	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	ND	1,68 ± 0,04	1,65 ± 0,05
	Cu (mg kg ⁻¹)	ND	< LD	1,11 ± 0,22
Intercambiable	Hg (mg kg ⁻¹)	ND	0,007 ± 0,001	0,015 ± 0,003
	Pb (mg kg ⁻¹)	ND	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	ND	1,40 ± 0,05	2,24 ± 0,55
	Cu (mg kg ⁻¹)	ND	< LD	<LD
Disponible	Hg (mg kg ⁻¹)	ND	0,013 ± 0,002	0,020 ± 0,004
	Pb (mg kg ⁻¹)	ND	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	ND	3,08 ± 0,09	3,89 ± 0,60
	Cu (mg kg ⁻¹)	ND	< LD	1,11 ± 0,22
Total	Hg (mg kg ⁻¹)	ND	7,1 ± 0,4	12,9 ± 1,5
	Pb (mg kg ⁻¹)	ND	89,9 ± 13,7	62,4 ± 4,9
	Zn (mg kg ⁻¹)	ND	155,8 ± 1,7	136,5 ± 4,9
	Cu (mg kg ⁻¹)	ND	34,3 ± 0,2	31,7 ± 4,0

		VZ-2		
	Parámetro	2010	2011	2013
	pH – H ₂ O (1:2,5)	ND	5,54	5,86
	CE (1:5) (μS cm ⁻¹)	ND	108,9	206,5
	CEe (dS cm ⁻¹)	ND	0,697	1,322
	MO (%)	ND	0,295	0,68
Soluble	Hg (mg kg ⁻¹)	ND	0,070 ± 0,000	0,073 ± 0,016
	Pb (mg kg ⁻¹)	ND	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	ND	1,00 ± 0,21	0,55 ± 0,05
	Cu (mg kg ⁻¹)	ND	1,10 ± 0,07	< LD
Intercambiable	Hg (mg kg ⁻¹)	ND	0,013 ± 0,001	0,012 ± 0,001
	Pb (mg kg ⁻¹)	ND	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	ND	0,58 ± 0,10	1,30 ± 0,25
	Cu (mg kg ⁻¹)	ND	< LD	< LD
Disponible	Hg (mg kg ⁻¹)	ND	0,0823 ± 0,0009	0,0850 ± 0,0171
	Pb (mg kg ⁻¹)	ND	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	ND	1,58 ± 0,32	1,85 ± 0,30
	Cu (mg kg ⁻¹)	ND	1,10 ± 0,07	< LD
Total	Hg (mg kg ⁻¹)	ND	44,7 ± 5,3	65,1 ± 5,0
	Pb (mg kg ⁻¹)	ND	68,9 ± 8,2	51,3 ± 2,1
	Zn (mg kg ⁻¹)	ND	150,2 ± 0,3	140,5 ± 7,8
	Cu (mg kg ⁻¹)	ND	37,7 ± 1,1	25,4 ± 2,5

		VZ-3		
	Parámetro	2010	2011	2013
	pH – H ₂ O (1:2,5)	ND	5,19	5,41
	CE (1:5) (μS cm ⁻¹)	ND	245	239,5
	CEe (dS cm ⁻¹)	ND	1,568	1,533
	MO (%)	ND	0,39	2,89
Soluble	Hg (mg kg ⁻¹)	ND	0,010 ± 0,002	0,005 ± 0,000
	Pb (mg kg ⁻¹)	ND	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	ND	3,50 ± 0,11	2,29 ± 0,15
	Cu (mg kg ⁻¹)	ND	1,25 ± 0,14	1,47 ± 0,03
Intercambiable	Hg (mg kg ⁻¹)	ND	0,006 ± 0,000	0,007 ± 0,000
	Pb (mg kg ⁻¹)	ND	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	ND	1,44 ± 0,08	1,87 ± 0,46
	Cu (mg kg ⁻¹)	ND	< LD	< LD
Disponible	Hg (mg kg ⁻¹)	ND	0,016 ± 0,002	0,012 ± 0,000
	Pb (mg kg ⁻¹)	ND	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	ND	4,94 ± 0,18	4,15 ± 0,61
	Cu (mg kg ⁻¹)	ND	1,25 ± 0,14	1,47 ± 0,03
Total	Hg (mg kg ⁻¹)	ND	19,0 ± 2,3	35,6 ± 8,2
	Pb (mg kg ⁻¹)	ND	64,6 ± 5,2	25,24 ± 1,4
	Zn (mg kg ⁻¹)	ND	167,5 ± 0,4	133,2 ± 1,5
	Cu (mg kg ⁻¹)	ND	27,6 ± 1,8	26,2 ± 1,3

		VZ-4		
	Parámetro	2010	2011	2013
	pH – H ₂ O (1:2,5)	5,81	5,48	6,015
	CE (1:5) (μS cm ⁻¹)	113,95	104,5	43,75
	CEe (dS cm ⁻¹)	0,729	0,669	0,280
	MO (%)	0,7	0,53	0,375
Soluble	Hg (mg kg ⁻¹)	0,009 ± 0,001	0,001 ± 0,000	0,006 ± 0,001
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	< LD	3,10 ± 0,31	1,10 ± 0,15
	Cu (mg kg ⁻¹)	< LD	2,85 ± 0,25	0,88 ± 0,23
Intercambiable	Hg (mg kg ⁻¹)	0,0243 ± 0,0077	0,0475 ± 0,002	0,009 ± 0,001
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	1,24 ± 0,05
	Cu (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
Disponible	Hg (mg kg ⁻¹)	0,033 ± 0,009	0,0486 ± 0,0017	0,016 ± 0,001
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	< LD	3,10 ± 0,31	2,34 ± 0,20
	Cu (mg kg ⁻¹)	< LD	2,85 ± 0,25	0,88 ± 0,23
Total	Hg (mg kg ⁻¹)	2,60 ± 0,71	14,6 ± 2,7	4,8 ± 0,9
	Pb (mg kg ⁻¹)	71,5 ± 10,8	43,4 ± 9,8	19,8 ± 4,7
	Zn (mg kg ⁻¹)	94,7 ± 2,6	100,2 ± 12,3	109,1 ± 1,9
	Cu (mg kg ⁻¹)	42,4 ± 3,5	33,2 ± 4,9	21,3 ± 0,8

		VZ-5		
	Parámetro	2010	2011	2013
	pH – H ₂ O (1:2,5)	5,83	4,97	4,405
	CE (1:5) (μS cm ⁻¹)	108,75	174,2	651,5
	CEe (dS cm ⁻¹)	0,696	1,12	4,17
	MO (%)	0,9	0,34	0,675
Soluble	Hg (mg kg ⁻¹)	0,014 ± 0,005	0,0009 ± 0,0003	0,011 ± 0,001
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	<LD	<LD	0,40 ± 0,14
	Cu (mg kg ⁻¹)	<LD	1,50 ± 0,49	< LD
Intercambiable	Hg (mg kg ⁻¹)	0,019 ± 0,004	0,044 ± 0,011	0,027 ± 0,005
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	2,74 ± 0,10
	Cu (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
Disponible	Hg (mg kg ⁻¹)	0,033 ± 0,009	0,045 ± 0,012	0,038 ± 0,007
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	3,14 ± 0,24
	Cu (mg kg ⁻¹)	<LD	1,50 ± 0,49	< LD
Total	Hg (mg kg ⁻¹)	33,3 ± 8,7	10,2 ± 1,2	39,7 ± 2,1
	Pb (mg kg ⁻¹)	80,3 ± 8,1	22,4 ± 3,8	28,8 ± 2,4
	Zn (mg kg ⁻¹)	63,1 ± 9,5	53,1 ± 12,1	71,5 ± 1,1
	Cu (mg kg ⁻¹)	27,9 ± 4,7	14,9 ± 0,9	15,9 ± 0,5

		VZ-6		
	Parámetro	2010	2011	2013
	pH – H ₂ O (1:2,5)	5,17	5,68	5,8
	CE (1:5) (μS cm ⁻¹)	457,5	96,65	131,7
	CEe (dS cm ⁻¹)	2,93	0,619	0,843
	MO (%)	0,6	0,92	0,35
Soluble	Hg (mg kg ⁻¹)	0,055 ± 0,004	0,107 ± 0,004	0,087 ± 0,007
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	1,03 ± 0,56	1,73 ± 0,25	0,32 ± 0,04
	Cu (mg kg ⁻¹)	2,08 ± 0,25	2,27 ± 0,25	1,24 ± 0,14
Intercambiable	Hg (mg kg ⁻¹)	0,0304 ± 0,0156	0,054 ± 0,004	0,0090 ± 0,0009
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	1,50 ± 0,15
	Cu (mg kg ⁻¹)	< LD	1,07 ± 0,24	< LD
Disponible	Hg (mg kg ⁻¹)	0,086 ± 0,019	0,161 ± 0,008	0,096 ± 0,007
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	1,03 ± 0,56	1,73 ± 0,25	1,81 ± 0,19
	Cu (mg kg ⁻¹)	2,08 ± 0,25	3,34 ± 0,48	1,24 ± 0,14
Total	Hg (mg kg ⁻¹)	132 ± 19	224 ± 4	195,7 ± 32,2
	Pb (mg kg ⁻¹)	148,2 ± 30,7	209,7 ± 32,2	70,8 ± 16,2
	Zn (mg kg ⁻¹)	86,1 ± 2,3	102,4 ± 5,1	103,5 ± 2,5
	Cu (mg kg ⁻¹)	32,6 ± 2,8	37,1 ± 5,6	21,0 ± 0,9

		VZ-7		
	Parámetro	2010	2011	2013
	pH – H ₂ O (1:2,5)	4,05	6,11	5,645
	CE (1:5) (μS cm ⁻¹)	652	105,75	144,9
	CEe (dS cm ⁻¹)	4,173	0,677	0,927
	MO (%)	0,4	0,28	0,425
Soluble	Hg (mg kg ⁻¹)	0,010 ± 0,001	0,062 ± 0,012	0,0641 ± 0,004
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	9,01 ± 1,73	0,86 ± 0,25	< LD
	Cu (mg kg ⁻¹)	1,19 ± 0,21	1,76 ± 0,12	1,43 ± 0,23
Intercambiable	Hg (mg kg ⁻¹)	0,022 ± 0,006	0,049 ± 0,002	0,0219 ± 0,005
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	< LD	0,62 ± 0,17	5,15 ± 0,29
	Cu (mg kg ⁻¹)	< LD	1,31 ± 0,13	< LD
Disponible	Hg (mg kg ⁻¹)	0,032 ± 0,006	0,111 ± 0,012	0,086 ± 0,009
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	9,01 ± 1,73	1,49 ± 0,42	5,15 ± 0,29
	Cu (mg kg ⁻¹)	1,19 ± 0,21	3,07 ± 0,26	1,43 ± 0,23
Total	Hg (mg kg ⁻¹)	108 ± 19	150 ± 20	390,2 ± 12,4
	Pb (mg kg ⁻¹)	192,1 ± 23,8	241,1 ± 26,7	234,7 ± 31,8
	Zn (mg kg ⁻¹)	207,2 ± 13,0	408,2 ± 25,0	565,5 ± 36,2
	Cu (mg kg ⁻¹)	29,3 ± 1,5	29,3 ± 2,5	31,5 ± 0,1

		VZ-8		
Parámetro		2010	2011	2013
pH – H ₂ O (1:2,5)		6,31	6,05	6,46
CE (1:5) (μS cm ⁻¹)		135,75	131,85	64,95
CEe (dS cm ⁻¹)		0,869	0,843	0,415
MO (%)		0,04	0,33	0,205
Soluble	Hg (mg kg ⁻¹)	0,12 ± 0,03	0,02 ± 0,00	0,14 ± 0,07
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	1,90 ± 0,03	1,9 ± 0,2	< LD
	Cu (mg kg ⁻¹)	1,12 ± 0,19	2,90 ± 0,16	1,77 ± 0,33
Intercambiable	Hg (mg kg ⁻¹)	0,02 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,00
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	1,37 ± 0,18
	Cu (mg kg ⁻¹)	< LD	1,24 ± 0,04	< LD
Disponible	Hg (mg kg ⁻¹)	0,14 ± 0,03	0,07 ± 0,01	0,17 ± 0,07
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	1,90 ± 0,03	1,9 ± 0,2	1,37 ± 0,18
	Cu (mg kg ⁻¹)	1,12 ± 0,19	4,14 ± 0,20	1,77 ± 0,33
Total	Hg (mg kg ⁻¹)	122 ± 10	75 ± 20	422,3 ± 37,3
	Pb (mg kg ⁻¹)	161,0 ± 0,4	143,2 ± 30	55,8 ± 8,9
	Zn (mg kg ⁻¹)	120,7 ± 10,2	170,0 ± 33,4	223,2 ± 13,7
	Cu (mg kg ⁻¹)	28,7 ± 0,9	31,1 ± 4,8	20,7 ± 2,0

		AZ-1		
Parámetro		2010	2011	2013
pH – H ₂ O (1:2,5)		6,18	7,38	7,355
CE (1:5) (μS cm ⁻¹)		263,5	77,7	82,35
CEe (dS cm ⁻¹)		1,687	0,497	0,527
MO (%)		0,5	0,28	0,185
Soluble	Hg (mg kg ⁻¹)	0,09 ± 0,02	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,02
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	2,15 ± 0,10	10,81 ± 0,98	ND
	Cu (mg kg ⁻¹)	1,25 ± 0,01	1,07 ± 0,18	ND
Intercambiable	Hg (mg kg ⁻¹)	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,01 ± 0,00
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	<LD	< LD	1,27 ± 0,26
	Cu (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	ND
Disponible	Hg (mg kg ⁻¹)	0,11 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,08 ± 0,02
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	2,15 ± 0,10	10,81 ± 0,98	1,27 ± 0,26
	Cu (mg kg ⁻¹)	1,25 ± 0,01	1,07 ± 0,18	ND
Total	Hg (mg kg ⁻¹)	394 ± 4	197 ± 4	723,8 ± 38,9
	Pb (mg kg ⁻¹)	224,3 ± 27,6	144,1 ± 10,2	74,4 ± 3,2
	Zn (mg kg ⁻¹)	123,7 ± 25,9	158,0 ± 30,4	120,7 ± 7,2
	Cu (mg kg ⁻¹)	47,7 ± 8,9	35,2 ± 3,4	30,8 ± 0,2

		AL-1		
Parámetro		2010	2011	2013
pH – H ₂ O (1:2,5)		5,64	6,34	6,16
CE (1:5) (μS cm ⁻¹)		359	69	120
CEe (dS cm ⁻¹)		2,2	0,44	0,77
MO (%)		0,83	0,46	0,85
Soluble	Hg (mg kg ⁻¹)	0,009 ± 0,001	0,007 ± 0,001	0,011 ± 0,001
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	0,68 ± 0,11	0,63 ± 0,09	0,78 ± 0,16
	Cu (mg kg ⁻¹)	2,83 ± 0,12	1,90 ± 0,10	2,62 ± 0,14
Intercambiable	Hg (mg kg ⁻¹)	0,032 ± 0,003	0,008 ± 0,000	0,029 ± 0,001
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	<LD	1,33 ± 0,02	1,47 ± 0,05
	Cu (mg kg ⁻¹)	<LD	< LD	< LD
Disponible	Hg (mg kg ⁻¹)	0,041 ± 0,004	0,015 ± 0,002	0,040 ± 0,002
	Pb (mg kg ⁻¹)	< LD	< LD	< LD
	Zn (mg kg ⁻¹)	<LD	1,96 ± 0,11	2,25 ± 0,21
	Cu (mg kg ⁻¹)	<LD	1,90 ± 0,10	2,62 ± 0,14
Total	Hg (mg kg ⁻¹)	7,3 ± 0,2	4,6 ± 0,5	4,7 ± 0,0
	Pb (mg kg ⁻¹)	69,2 ± 4,8	55,8 ± 1,5	50,4 ± 3,9
	Zn (mg kg ⁻¹)	92,5 ± 0,4	76,7 ± 0,2	85,1 ± 0,2
	Cu (mg kg ⁻¹)	17,4 ± 0,8	15,1 ± 0,2	18,1 ± 0,3

2. Concentraciones de metales pesados en cada una de las fracciones de los sedimentos analizados mediante la extracción secuencial de Sánchez et al. (2005).

	VZ-0							
	2010				2011			
Fracción	Hg	Pb	Zn	Cu	Hg	Pb	Zn	Cu
Soluble	0,010 ± 0,000	<LD	<LD	<LD	0,001 ± 0,000	<LD	0,51 ± 0,07	<LD
Intercambiable	0,020 ± 0,003	<LD	<LD	<LD	0,035 ± 0,008	<LD	<LD	<LD
Carbonatos	0,007 ± 0,000	15,43 ± 3,68	18,16 ± 1,60	3,11 ± 0,7	0,017 ± 0,001	<LD	16,14 ± 5,11	9,8 ± 0,2
Ox. Amorfos de Fe y Mn	0,003 ± 0,000	11,37 ± 1,64	7,06 ± 1,49	8,46 ± 2,26	0,011 ± 0,002	8,90± 1,30	<LD	1,42 ± 0,04
Ox. Cristalinos de Fe y Mn	1,35 ± 0,01	20,83 ± 1,85	68,14 ± 2,55	23,19 ± 5,04	7,47 ± 0,04	16,47 ± 3,69	76,73 ± 0,19	26,35 ± 0,04
Materia orgánica	0,015 ± 0,003	<LD	<LD	<LD	0,143 ± 0,005	<LD	<LD	<LD
Residuo Final	0,139 ± 0,035	12,29 ± 1,71	2,20 ± 0,27	12,29 ± 1,32	0,25 ± 0,04	<LD	2,31 ± 0,20	<LD

Fracción	VZ-4							
	2010				2011			
	Hg	Pb	Zn	Cu	Hg	Pb	Zn	Cu
Soluble	0,009 ± 0,001	<LD	<LD	<LD	0,001 ± 0,000	<LD	3,10 ± 0,31	2,85 ± 0,25
Intercambiable	0,024 ± 0,008	<LD	<LD	<LD	0,048 ± 0,002	<LD	<LD	<LD
Carbonatos	0,017 ± 0,002	11,42 ± 1,26	9,76 ± 0,4	4,56 ± 0,49	0,015 ± 0,001	7,31 ± 2,11	9,81 ± 2,8	2,80 ± 0,2
Ox. Amorfos de Fe y Mn	0,021 ± 0,005	13,83 ± 1,71	6,14 ± 0,3	<LD	0,013 ± 0,001	7,81 ± 1,22	<LD	2,12 ± 0,43
Ox. Cristalinos de Fe y Mn	4,17 ± 0,01	30,88 ± 3,82	75,15 ± 0,7	22,19 ± 0,63	15,24 ± 0,06	<LD	83,86 ± 2,48	28,19 ± 1,83
Materia orgánica	0,718 ± 0,042	<LD	<LD	<LD	0,84 ± 0,01	<LD	<LD	<LD
Residuo Final	0,663 ± 0,022	15,4 ± 3,1	3,62 ± 1,21	15,49 ± 2,21	1,27 ± 0,04	28,30 ± 6,44	7,76 ± 0,6	<LD

Fracción	VZ-5							
	2010				2011			
	Hg	Pb	Zn	Cu	Hg	Pb	Zn	Cu
Soluble	0,014 ± 0,005	<LD	<LD	<LD	0,001 ± 0,000	<LD	<LD	1,50 ± 0,49
Intercambiable	0,019 ± 0,004	<LD	<LD	<LD	0,044 ± 0,011	<LD	<LD	<LD
Carbonatos	0,013 ± 0,000	11,73 ± 1,94	0,49 ± 0,02	<LD	0,030 ± 0,006	14,54 ± 1,95	5,31 ± 1,53	<LD
Ox. Amorfos de Fe y Mn	0,019 ± 0,002	17,79 ± 3,28	2,43 ± 0,33	<LD	0,033 ± 0,004	7,9 ± 1,85	<LD	1,45 ± 0,1
Ox. Cristalinos de Fe y Mn	26,33 ± 1,60	47,83 ± 8,93	56,58 ± 8,31	13,09 ± 3,56	10,20 ± 0,16	<LD	48,5 ± 19,79	11,6 ± 0,3
Materia orgánica	4,08 ± 0,27	<LD	<LD	<LD	0,103 ± 0,012	<LD	<LD	<LD
Residuo Final	13,40 ± 0,03	21,19 ± 1,67	3,62 ± 0,80	14,79 ± 1,16	4,80 ± 0,03	13,2 ± 3,17	3,93 ± 0,66	<LD

Fracción	VZ-6							
	2010				2011			
	Hg	Pb	Zn	Cu	Hg	Pb	Zn	Cu
Soluble	0,055 ± 0,004	<LD	1,03 ± 0,56	2,08 ± 0,25	0,107 ± 0,004	<LD	1,73 ± 0,25	2,27 ± 0,25
Intercambiable	0,030 ± 0,016	<LD	<LD	<LD	0,053 ± 0,004	<LD	<LD	1,07 ± 0,24
Carbonatos	0,025 ± 0,000	24,78 ± 3,35	6,05 ± 1,74	<LD	0,027 ± 0,001	51,73 ± 1,34	12,97 ± 1,46	<LD
Ox. Amorfos de Fe y Mn	0,051 ± 0,010	32,56 ± 4,61	7,59 ± 0,25	<LD	0,116 ± 0,007	49,63 ± 7,18	<LD	5,8 ± 0,21
Ox. Cristalinos de Fe y Mn	111,4 ± 4,00	84,07 ± 19,73	71,38 ± 3,72	13,95 ± 0,81	186,3 ± 16,6	42,3 ± 8,77	76,25 ± 2,76	26,1 ± 3,11
Materia orgánica	18,46 ± 2,83	<LD	<LD	<LD	6,04 ± 0,74	<LD	<LD	<LD
Residuo Final	40,20 ± 0,79	13,28 ± 0,61	<LD	14,44 ± 0,57	81,3 ± 22,12	33,8 ± 2,55	11,7 ± 1,27	<LD

Fracción	VZ-7							
	2010				2011			
	Hg	Pb	Zn	Cu	Hg	Pb	Zn	Cu
Soluble	0,010 ± 0,000	<LD	9,01 ± 1,73	1,19 ± 0,21	0,062 ± 0,011	<LD	0,86 ± 0,25	1,76 ± 0,12
Intercambiable	0,022 ± 0,006	<LD	<LD	<LD	0,049 ± 0,002	<LD	0,62 ± 0,17	1,31 ± 0,13
Carbonatos	0,019 ± 0,000	61,67 ± 4,51	24,23 ± 1,51	<LD	0,033 ± 0,003	132,2 ± 38,75	66,37 ± 1,39	<LD
Ox. Amorfos de Fe y Mn	0,033 ± 0,004	38,14 ± 1,04	17,58 ± 1,71	<LD	0,024 ± 0,003	60,24 ± 2,35	<LD	3,81 ± 0,47
Ox. Cristalinos de Fe y Mn	80,28 ± 9,41	79,69 ± 0,46	153,18 ± 3,52	15,10 ± 2,83	82,49 ± 9,46	37,98 ± 0,60	276,61 ± 10,6	21,73 ± 0,33
Materia orgánica	8,56 ± 1,34	15,24 ± 3,12	<LD	<LD	5,88 ± 1,24	<LD	52,69 ± 11,58	<LD
Residuo Final	51,87 ± 13,71	12,58 ± 2,86	6,36 ± 1,39	16,19 ± 0,44	101,5 ± 20,28	19,9 ± 1,8	11,48 ± 0,96	<LD

Fracción	VZ-8							
	2010				2011			
	Hg	Pb	Zn	Cu	Hg	Pb	Zn	Cu
Soluble	0,116 ± 0,029	<LD	1,90 ± 0,03	1,121 ± 0,192	0,020 ± 0,001	<LD	1,9 ± 0,2	2,90 ± 0,18
Intercambiable	0,019 ± 0,003	<LD	<LD	<LD	0,045 ± 0,007	<LD	<LD	1,24 ± 0,04
Carbonatos	0,021 ± 0,001	23,51 ± 1,02	0,026 ± 0,11	<LD	0,018 ± 0,002	40,09 ± 1,82	24,5 ± 0,40	<LD
Ox. Amorfos de Fe y Mn	0,030 ± 0,001	36,78 ± 1,18	19,70 ± 0,17	<LD	0,033 ± 0,001	28,18 ± 0,46	<LD	3,23 ± 0,74
Ox. Cristalinos de Fe y Mn	159,98 ± 6,42	87,20 ± 5,83	77,51 ± 9,91	16,85 ± 0,03	93,3 ± 0,09	43,4 ± 6,23	131,8 ± 30,6	23,7 ± 3,96
Materia orgánica	25,31 ± 0,96	13,50 ± 4,03	<LD	<LD	17,46 ± 1,55	<LD	<LD	<LD
Residuo Final	40,83 ± 0,25	<LD	<LD	10,74 ± 0,68	340,3 ± 20,5	16,07 ± 4,35	12,7 ± 1,84	<LD

Fracción	AZ-1							
	2010				2011			
	Hg	Pb	Zn	Cu	Hg	Pb	Zn	Cu
Soluble	0,086 ± 0,018	<LD	2,15 ± 0,10	1,25 ± 0,01	0,051 ± 0,005	<LD	10,81 ± 0,98	1,07 ± 0,18
Intercambiable	0,026 ± 0,001	<LD	<LD	<LD	0,043 ± 0,001	<LD	<LD	<LD
Carbonatos	0,021 ± 0,001	17,97 ± 0,72	15,43 ± 5,54	<LD	0,025 ± 0,003	40,09 ± 1,82	24,52 ± 0,40	<LD
Ox. Amorfos de Fe y Mn	0,061 ± 0,002	36,33 ± 0,57	12,04 ± 0,34	<LD	0,045 ± 0,001	26,9 ± 5,09	<LD	3,975 ± 0,39
Ox. Cristalinos de Fe y Mn	234,06 ± 8,81	97,50 ± 1,08	76,27 ± 19,93	27,99 ± 8,79	127,80 ± 3,43	55,1 ± 3,68	117,9 ± 29,9	30,65 ± 2,19
Materia orgánica	33,67 ± 0,74	26,78 ± 7,60	<LD	<LD	15,77 ± 6,07	<LD	<LD	<LD
Residuo Final	132,89 ± 1,38	45,07 ± 2,90	<LD	12,13 ± 0,08	130,70 ± 4,86	46,8 ± 12,45	18,2 ± 2,56	<LD

3. Concentraciones de Hg, Pb, Zn y Cu en cada una de las fracciones de *T. domingensis*.

Fracción	Año	Hg									
		VZ-0	VZ-1	VZ-2	VZ-3	VZ-4	VZ-5	AZ-1	VZ-6	VZ-7	VZ-8
Hoja	2010	0,19 ± 0,02	ND	ND	ND	0,24 ± 0,01	0,22 ± 0,04	1,00 ± 0,11	0,64 ± 0,02	0,42 ± 0,04	0,56 ± 0,05
	2011	0,08 ± 0,01	0,27 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,14 ± 0,03	0,12 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,57 ± 0,03	0,80 ± 0,04	0,65 ± 0,03	0,30 ± 0,02
	2013	0,07 ± 0,00	ND	0,14 ± 0,01	ND	0,07 ± 0,01	0,04 ± 0,00	0,14 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,12 ± 0,00	0,09 ± 0,01
Base radicular	2010	0,34 ± 0,03	ND	ND	ND	0,24 ± 0,03	0,29 ± 0,02	11,08 ± 1,02	8,71 ± 0,58	2,77 ± 0,27	3,09 ± 0,46
	2011	ND	0,27 ± 0,04	0,80 ± 0,15	0,29 ± 0,02	0,29 ± 0,05	0,96 ± 0,12	29,80 ± 5,59	23,00 ± 1,38	5,28 ± 0,25	3,30 ± 0,17
	2013	0,07 ± 0,01	ND	0,37 ± 0,06	ND	0,12 ± 0,01	0,57 ± 0,08	4,24 ± 0,01	1,60 ± 0,32	1,62 ± 0,01	0,77 ± 0,09
Rizoma	2010	0,15 ± 0,01	ND	ND	ND	0,27 ± 0,01	ND	ND	5,50 ± 0,43	3,14 ± 0,33	3,44 ± 0,40
	2011	ND	0,16 ± 0,03	0,96 ± 0,12	2,42 ± 0,45	0,19 ± 0,02	0,68 ± 0,11	9,34 ± 1,27	12,18 ± 1,32	2,82 ± 0,65	1,35 ± 0,12
	2013	0,05 ± 0,01	ND	0,32 ± 0,04	ND	0,07 ± 0,02	0,20 ± 0,03	0,31 ± 0,06	0,66 ± 0,14	0,65 ± 0,08	0,40 ± 0,06
Raíz	2010	0,55 ± 0,08	ND	ND	ND	0,72 ± 0,08	2,03 ± 0,28	40,29 ± 6,78	18,98 ± 1,27	9,34 ± 1,46	13,43 ± 2,36
	2011	ND	9,89 ± 0,66	7,64 ± 0,58	1,70 ± 0,15	0,59 ± 0,04	2,85 ± 0,28	88,05 ± 10,42	94,31 ± 9,61	16,45 ± 2,49	8,05 ± 0,38
	2013	0,25 ± 0,03	ND	2,12 ± 0,29	ND	0,44 ± 0,03	1,97 ± 0,40	4,38 ± 0,56	3,14 ± 0,59	2,50 ± 0,29	4,95 ± 0,46

Fracción	Año	Pb									
		VZ-0	VZ-1	VZ-2	VZ-3	VZ-4	VZ-5	AZ-1	VZ-6	VZ-7	VZ-8
Hoja	2010	< LD	ND	ND	ND	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	2011	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
	2013	< LD	ND	< LD	ND	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD	< LD
Base radicular	2010	12,29 ± 0,23	ND	ND	ND	11,68 ± 0,95	21,80 ± 1,02	16,91 ± 2,94	20,18 ± 1,74	22,25 ± 2,15	18,72 ± 3,69
	2011	ND	11,12 ± 0,07	8,08 ± 1,46	10,13 ± 2,00	< LD	< LD	10,17 ± 0,08	10,14 ± 0,78	19,99 ± 1,78	9,46 ± 0,10
	2013	13,61 ± 0,79	ND	11,52 ± 2,68	ND	6,84 ± 1,00	11,27 ± 2,98	18,05 ± 1,53	13,35 ± 1,01	18,50 ± 1,77	9,14 ± 2,45
Rizoma	2010	22,31 ± 0,33	ND	ND	ND	28,60 ± 2,00	ND	ND	24,43 ± 0,99	9,68 ± 0,83	15,93 ± 1,38
	2011	ND	8,92 ± 1,25	9,06 ± 2,69	8,15 ± 0,51	< LD	< LD	< LD	< LD	9,71 ± 4,07	< LD
	2013	20,41 ± 0,76	ND	22,20 ± 2,66	ND	42,64 ± 1,05	50,09 ± 3,05	4,55 ± 0,00	4,67 ± 0,97	68,16 ± 4,44	7,45 ± 0,96
Raíz	2010	22,07 ± 3,32	ND	ND	ND	26,18 ± 0,84	72,77 ± 6,54	45,07 ± 2,14	45,88 ± 1,13	119,18 ± 5,57	66,90 ± 2,24
	2011	ND	19,51 ± 2,69	31,80 ± 5,30	25,10 ± 4,70	< LD	23,17 ± 6,22	34,91 ± 5,40	74,61 ± 0,85	155,2 ± 12,7	57,52 ± 1,51
	2013	26,63 ± 7,08	ND	21,37 ± 2,17	ND	15,45 ± 3,00	14,61 ± 2,92	31,54 ± 1,67	17,62 ± 0,37	99,07 ± 1,94	68,99 ± 0,24

		Cu									
Fracción	Año	VZ-0	VZ-1	VZ-2	VZ-3	VZ-4	VZ-5	AZ-1	VZ-6	VZ-7	VZ-8
Hoja	2010	3,63 ± 0,25	ND	ND	ND	4,70 ± 0,15	3,14 ± 0,15	3,53 ± 0,10	4,21 ± 0,19	2,81 ± 0,15	4,74 ± 0,83
	2011	5,10 ± 0,45	3,39 ± 0,20	3,40 ± 0,20	5,70 ± 0,33	3,79 ± 0,52	6,16 ± 0,98	4,62 ± 0,33	4,72 ± 0,35	4,93 ± 1,08	4,23 ± 0,11
	2013	3,86 ± 0,20	ND	10,38 ± 2,18	ND	4,50 ± 0,35	2,96 ± 0,25	9,04 ± 2,08	5,83 ± 0,60	6,45 ± 0,24	7,35 ± 0,72
Núcleo radicular	2010	5,94 ± 0,49	ND	ND	ND	12,91 ± 0,10	6,13 ± 0,52	12,55 ± 0,87	9,99 ± 0,04	11,37 ± 0,20	15,09 ± 0,29
	2011	ND	11,12 ± 0,21	22,58 ± 2,57	11,72 ± 0,31	11,19 ± 0,55	3,30 ± 0,08	14,20 ± 0,32	8,91 ± 0,66	6,65 ± 0,98	6,08 ± 0,02
	2013	6,68 ± 0,58	ND	10,49 ± 0,09	ND	15,09 ± 0,34	5,84 ± 0,04	12,84 ± 0,07	12,50 ± 0,22	14,06 ± 0,81	16,70 ± 0,04
Rizoma	2010	4,16 ± 0,07	ND	ND	ND	6,40 ± 0,33	ND	ND	7,54 ± 0,16	3,15 ± 0,36	13,94 ± 0,42
	2011	ND	4,22 ± 0,06	4,60 ± 0,43	7,18 ± 0,14	4,49 ± 0,07	3,56 ± 0,22	7,50 ± 0,28	7,79 ± 0,05	3,81 ± 0,19	3,79 ± 0,34
	2013	12,15 ± 0,19	ND	14,25 ± 0,65	ND	13,55 ± 0,01	11,09 ± 0,81	3,67 ± 0,79	1,21 ± 0,10	14,35 ± 0,32	3,94 ± 0,01
Raíz	2010	8,59 ± 0,22	ND	ND	ND	22,83 ± 0,15	10,19 ± 0,16	23,75 ± 0,25	29,95 ± 0,05	14,36 ± 0,37	19,66 ± 0,52
	2011	ND	9,43 ± 0,25	17,80 ± 0,20	10,40 ± 0,20	10,45 ± 1,24	12,70 ± 0,11	27,37 ± 2,62	12,71 ± 0,14	12,49 ± 2,63	2,92 ± 0,09
	2013	14,59 ± 0,50	ND	17,93 ± 0,25	ND	14,94 ± 0,27	9,92 ± 0,30	20,32 ± 0,43	6,94 ± 0,80	9,20 ± 0,15	27,39 ± 0,35

		Zn									
Fracción	Año	VZ-0	VZ-1	VZ-2	VZ-3	VZ-4	VZ-5	AZ-1	VZ-6	VZ-7	VZ-8
Hoja	2010	17,20 ± 0,00	ND	ND	ND	13,66 ± 0,15	11,68 ± 0,74	12,57 ± 0,00	17,21 ± 0,48	28,91 ± 0,30	24,60 ± 1,13
	2011	20,99 ± 1,32	12,15 ± 0,15	13,85 ± 0,15	9,51 ± 1,29	9,23 ± 0,92	9,75 ± 0,90	23,30 ± 1,92	10,97 ± 1,38	14,15 ± 0,36	11,48 ± 2,17
	2013	42,06 ± 0,46	ND	14,14 ± 0,60	ND	13,26 ± 0,30	8,48 ± 0,10	18,92 ± 0,25	15,46 ± 0,46	27,63 ± 0,89	21,82 ± 1,89
Núcleo Radicular	2010	104,79 ± 2,37	ND	ND	ND	36,97 ± 0,99	11,50 ± 2,65	58,98 ± 2,09	98,06 ± 2,17	109,80 ± 0,39	152,22 ± 7,22
	2011	ND	56,19 ± 0,25	116,1 ± 18,1	90,60 ± 0,68	48,83 ± 2,58	26,62 ± 1,17	111,55 ± 8,50	45,65 ± 4,54	120,20 ± 2,30	49,32 ± 2,36
	2013	41,58 ± 0,38	ND	36,21 ± 2,44	ND	43,09 ± 0,44	24,95 ± 0,50	25,20 ± 1,40	15,89 ± 0,05	96,23 ± 11,89	58,22 ± 4,13
Rizoma	2010	42,18 ± 8,29	ND	ND	ND	22,33 ± 0,20	ND	ND	36,80 ± 0,05	23,02 ± 0,12	50,90 ± 0,24
	2011	ND	14,19 ± 0,11	13,91 ± 0,89	28,46 ± 0,14	13,58 ± 0,39	14,44 ± 2,18	37,71 ± 1,19	52,64 ± 8,54	79,27 ± 15,00	17,67 ± 0,52
	2013	19,80 ± 1,20	ND	20,80 ± 2,34	ND	12,79 ± 1,73	14,48 ± 0,44	42,92 ± 0,17	17,51 ± 5,51	50,97 ± 1,55	29,66 ± 0,76
Raíz	2010	109,40 ± 0,27	ND	ND	ND	25,00 ± 0,25	44,59 ± 0,64	97,41 ± 0,50	44,17 ± 0,25	71,04 ± 0,12	68,10 ± 0,17
	2011	ND	28,89 ± 0,25	38,00 ± 0,50	33,60 ± 0,20	39,24 ± 4,94	23,71 ± 0,84	48,22 ± 4,63	58,69 ± 0,93	121,79 ± 6,88	29,16 ± 0,45
	2013	31,42 ± 0,25	ND	53,70 ± 0,30	ND	50,25 ± 0,93	23,83 ± 0,45	49,19 ± 0,48	15,28 ± 0,85	102,65 ± 1,19	53,90 ± 3,35

4. Datos recogidos y utilizados para el modelo de biomasa de *T. domingensis*

DATOS BIOMASA				
Altura máxima (cm)	Diámetro menor (cm)	Diámetro mayor (cm)	Volumen (cm ³)	Peso seco de la hoja (g)
13,9	0,80	0,85	2,5	0,4
20,4	0,65	0,80	2,8	0,5
20,9	0,85	0,90	4,2	0,4
25,3	0,80	0,90	4,8	0,3
29,5	0,75	0,90	5,2	0,3
46,5	0,50	0,60	3,7	0,2
49,2	0,90	1,00	11,6	0,3
56	0,95	1,05	14,6	0,6
61	0,80	1,00	12,8	0,7
76	1,00	1,20	23,9	1,6
80,1	1,00	1,25	26,2	1,8
86	0,70	0,80	12,6	1,1
96,6	0,85	0,95	20,4	2,0
102,4	1,20	1,40	45,0	3,5
104	1,80	1,90	93,1	4,8
109,6	0,75	0,90	19,4	3,2
116,7	1,00	1,00	30,6	2,1
129,3	1,45	1,70	83,4	6,5
134	1,60	1,70	95,4	6,9
135	1,60	1,70	96,1	7,6
137,1	1,70	2,40	146,4	9,4
149,4	1,90	2,55	189,5	12,9
150,4	2,40	3,35	316,6	17,0
154	2,00	3,00	241,9	17,8
173	1,50	2,00	135,9	9,8
175,9	1,50	1,90	131,2	9,4
176	1,50	1,65	114,0	8,7
181,1	1,80	2,40	204,8	11,0
188	2,35	3,00	347,0	16,7
196,5	2,80	3,45	496,9	26,1
207,3	2,35	3,10	395,4	18,7
208,7	3,05	3,60	599,9	27,6
215,5	2,45	2,80	387,0	28,5
216,5	2,80	3,15	499,9	24,3
239,1	2,40	3,00	450,7	25,2
242,4	2,60	3,20	528,0	30,4
260,1	2,85	4,10	795,7	46,3