

Estudio de la Absorción y Distribución
del Mercurio en *Nerium Oleander* L.
en la Ribera del Río Valdeazogues
(Estación de Chillón - Almadén)

I. López-Tejedor

M. J. Sierra

J. Rodríguez

R. Millán

Toda correspondencia en relación con este trabajo debe dirigirse al Servicio de Información y Documentación, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas, Ciudad Universitaria, 28040-MADRID, ESPAÑA.

Las solicitudes de ejemplares deben dirigirse a este mismo Servicio.

Los descriptores se han seleccionado del Thesaurus del DOE para describir las materias que contiene este informe con vistas a su recuperación. La catalogación se ha hecho utilizando el documento DOE/TIC-4602 (Rev. 1) Descriptive Cataloguing On-Line, y la clasificación de acuerdo con el documento DOE/TIC.4584-R7 Subject Categories and Scope publicados por el Office of Scientific and Technical Information del Departamento de Energía de los Estados Unidos.

Se autoriza la reproducción de los resúmenes analíticos que aparecen en esta publicación.

Catálogo general de publicaciones oficiales
<http://www.060.es>

Depósito Legal: M -14226-1995

ISSN: 1135 - 9420

NIPO: 471-10-041-7

Editorial CIEMAT

CLASIFICACIÓN DOE Y DESCRIPTORES

S54

SURFACE CONTAMINATION; ABSORPTION; MERCURY; SPAIN; ENVIRONMENTAL
IMPACTS; SOIL CHEMISTRY; HEAVY METALS

Estudio de la Absorción y Distribución del Mercurio en *Nerium Oleander* L. en la Ribera del Río Valdeazogues (Estación de Chillón - Almadén)

López-Tejedor, I.; Sierra, M.J.; Rodríguez, J.; Millán, R.

41pp. 14 figs. 67 refs.

Resumen:

El principal objetivo de este estudio es determinar la absorción y distribución del mercurio en la adelfa (*Nerium oleander* L) en la ribera del río Valdeazogues, situado dentro de la Comarca minera de Almadén (Ciudad Real). Los resultados muestran que las concentraciones de mercurio total en suelo varían entre $116,7 \pm 24,3$ y $350,9 \pm 68,6$ mg kg⁻¹ de Hg, sin embargo la fracción fácilmente disponible (soluble+intercambiable) es muy baja alcanzando valores que van desde $0,257 \pm 0,013$ hasta $0,017 \pm 0,000$ mg kg⁻¹ de Hg, suponiendo menos del 0,16 % de la concentración total de mercurio medido directamente sobre la muestra del suelo. La distribución del mercurio absorbido por *N. oleander* no es homogénea en toda la parte aérea. En general, la concentración es significativamente mayor en las hojas seguida de los tallos y los frutos. Según los resultados, aunque la concentración de mercurio en la planta no es muy elevada (Hoja: $0,282 \pm 0,014$ - $1,022 \pm 0,110$ mg Kg⁻¹; Tallo: $0,087 \pm 0,011$ - $0,354 \pm 0,046$ mg Kg⁻¹; Fruto: $0,030 \pm 0,003$ - $0,077 \pm 0,009$ mg kg⁻¹), la adelfa presenta una serie de características (alta biomasa, toxicidad, no comestible), que la pueden convertir en una futura candidata como fitoextractora de mercurio, en procesos de descontaminación de suelos.

Study of Absorption and Distribution of Mercury in *Nerium Oleander* L. on Banks of the Valdeazogues River (Chillón Station- Ciudad Real)

López-Tejedor, I.; Sierra, M.J.; Rodríguez, J.; Millán, R.

41pp. 14 figs. 67 refs.

Abstract:

The main objective of this study is to determine the absorption and distribution of mercury in oleander (*Nerium oleander* L.) in the Valdeazogues river, located within the mining regions of Almadén (Ciudad Real). The results show that total mercury concentrations in soil range from $116,7 \pm 24,3$ to $350,9 \pm 68,6$ mg kg⁻¹ of Hg, but the readily available fraction (soluble + exchangeable) is very low (from $0,013$ to $0,017 \pm 0,257 \pm 0,000$ mg Hg kg⁻¹: less than 0,16% of the total concentration of mercury measured directly on the soil sample). The distribution of mercury absorbed by *N. oleander* is not homogeneous throughout the aerial part. In general, the concentration is significantly higher in the leaves followed by stems and fruits. According to the results, although the concentration of mercury in the plant is not very high (Leaves: $0,282 \pm 0,014$ - $1,022 \pm 0,110$ mg Kg⁻¹; Stems: $0,087 \pm 0,011$ - $0,354 \pm 0,046$ mg Kg⁻¹; Fruits: $0,030 \pm 0,003$ - $0,077 \pm 0,009$ mg Kg⁻¹), oleander has a number of characteristics (high biomass, toxicity, non-edible) that could turn into a future candidate as phytoextraction of mercury in decontamination processes.



“Con constancia y tenacidad se obtiene lo que se desea, la palabra imposible no tiene significado”

Napoleón Bonaparte

INDICE

	Págs.
1. INTRODUCCIÓN: EL MERCURIO, PROPIEDADES, ESTADO Y MOVILIDAD EN LOS AGENTES DEL MEDIO AMBIENTE	1
1.1 Propiedades físico-químicas del mercurio	1
1.2 Principales fuentes de liberación del mercurio	2
1.3 Ciclo biogeoquímico del mercurio y distribución en el medio ambiente	2
1.4 Factores que influyen en la movilidad y biodisponibilidad del mercurio en el suelo	4
1.5 Transferencia suelo-planta del mercurio	6
2. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO	7
2.1 Marco geográfico del área de estudio	7
2.2 Marco climático del área de estudio	8
2.3 Marco geológico del área de estudio	9
2.4 Marco florístico del área de estudio	9
3. DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA DE ESTUDIO: ADELFA (<i>Nerium oleander</i>)	10
4. OBJETIVOS DEL PROYECTO	11
5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	11
5.1 Recogida de muestras	11
5.2 Preparación y acondicionamiento de las muestras de adelfa (<i>Nerium oleander</i>)	12
5.3 Preparación y acondicionamiento de muestras de suelo	12
5.4 Caracterización físico-química del suelo	13
5.5 Medida de la concentración total de mercurio en suelo y planta	13
5.6 Determinación del mercurio fácilmente disponible en el suelo	14
5.7 Validación de los resultados dados por el AMA 254	14
6. PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO	14

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	15
7.1 Caracterización físico-química del suelo	15
7.2 Concentración total de mercurio en suelo	16
7.3 Concentración total de mercurio en planta y distribución en los tejidos	17
7.4 Deposición superficial del mercurio en hojas	20
7.5 Transferencia del mercurio suelo-planta	22
8. CONCLUSIONES	23
9. BIBLIOGRAFÍA	25
10. AGRADECIMIENTOS	29

INDICE DE ANEXOS

	Págs.
ANEXO I. Propiedades físico-químicas del mercurio	33
ANEXO II. Mapa de localización de las principales explotaciones mineras del distrito de Almadén (Ciudad Real)	34
ANEXO III. Medición del pH en agua y en cloruro potásico por medio de pH-metros en una suspensión de mezcla suelo-líquido de (1:2,5)	35
ANEXO IV. Medición de la conductividad eléctrica en una suspensión de mezcla suelo-líquido (1:2,5) y (1:5)	36
ANEXO V. Determinación de la materia orgánica del suelo por oxidación (Método de <i>Walkey-Black</i>)	37
ANEXO VI. Medida de la concentración total de mercurio de suelo o planta (Analizador Avanzado de Mercurio - AMA 254)	39
ANEXO VII. ETAPA 1 Y ETAPA 2 de la Extracción secuencial de suelo bulk	41
ANEXO VIII. Tratamiento estadístico de los datos	42

INDICE DE TABLAS

	Págs.
Tabla 1. Valor certificado de patrón contrastado con valor obtenido en AMA 254	14
Tabla 2. Resultado de la medida de pH, CE, temperatura y % de materia orgánica de los suelos bulk	15
Tabla 3. Concentración de mercurio total y mercurio asimilable en suelo bulk	16
Tabla 4. Pruebas robustas de igualdad de medias de la [Hg] hoja, [Hg] en tallo y [Hg] en fruto en los años 2007 y 2008	18
Tabla 5. Pruebas robustas de igualdad de medias de la [Hg] en planta en 2007 y 2008	19
Tabla 6. Pruebas de homogeneidad de varianzas de las variables [Hg] lavada y no lavada.	20
Tabla 7. Pruebas robustas de igualdad de medias de la [Hg] en hoja lavada y no lavada en 2007 y 2008	20
Tabla 8. ANOVA de 1 factor para las variables [Hg] en hoja y tipo de tratamiento (lavada y no lavada) en el año 2007	21
Tabla 9. Pruebas robustas de igualdad de medias de la [Hg] en hoja lavada y no lavada en 2008	21
Tabla 10. Concentraciones medias de Hg (mg kg^{-1}) en hoja, tallo, fruto y raíz para el punto de muestreo 5	23
Tabla 11. Etapas de extracción secuencial en siete pasos para suelos de Almadén	41

INDICE DE FIGURAS

	Págs.
Figura 1. Esquema del ciclo biogeoquímico del mercurio	4
Figura 2. Especiación del Hg (II) en suelos en función del pH	4
Figura 3. Variación del mercurio en solución en función del pH	5
Figura 4. Situación geográfica del área de estudio (Chillón-Ciudad Real)	7
Figura 5. Situación geográfica de la zona de muestreo (Chillón-Ciudad Real)	7

Figura 6. Climogramas de los años 2007 y 2008 de la Estación meteorológica de las Minas de Almadén (Ciudad Real)	8
Figura 7. Localización, esquema geológico y columna estratigráfica del Sinclinal de Almadén, indicando la localización de las principales mineralizaciones de mercurio	9
Figura 8. Detalle de un ejemplar de adelfa (<i>Nerium oleander</i>)	10
Figura 9. Mapa de distribución de la adelfa (<i>Nerium oleander</i>)	10
Figura 10. Foto aérea de la zona de estudio y coordenadas GPS de los puntos de muestreo	12
Figura 11. pH-metro modelo 250	35
Figura 12. Conductivímetro Crison EC-Meter Basic 30 ⁺	36
Figura 13. Analizador Avanzado de Mercurio AMA 254	39
Figura 14. Esquema funcional del AMA 254	40

INDICE DE GRÁFICOS

	Págs.
Gráfico 1. Diagrama de cajas de la concentración de Hg en suelo en 2007 y 2008	17
Gráfico 2. Diagrama de cajas de la concentración de Hg total (mg kg^{-1}) en planta en el 2007 y 2008	18
Gráfico 3. Diagrama de cajas de la concentración de Hg total (mg kg^{-1}) en hoja lavada (W) y no lavada (UNW) en el 2007 y 2008	21
Gráfico 4. Diagrama de cajas del BAF en hoja, tallo y fruto en el 2007 y 2008	22

1. INTRODUCCIÓN.

La contaminación y la degradación de los recursos naturales, entre ellos el suelo, supone un gran problema actualmente. Entre los impactos más graves que éste sufre se puede destacar la contaminación por metales pesados, por su lenta y difícil restauración. Dentro de los metales pesados uno de los que más problemas acarrea por su elevada toxicidad es el mercurio, el cual es considerado un contaminante a escala global.

La entrada de mercurio en el suelo puede ser debida a numerosas causas, entre ellas la extracción minera. En este caso, el área de estudio elegida se encuentra dentro del antiguo distrito minero de Almadén que supone un caso único a escala mundial, ya que de esta zona se ha extraído el 30 % del mercurio consumido por la humanidad desde tiempos históricos. Debido a ello y como consecuencia de la actividad minera y metalúrgica llevadas a cabo allí desde la época romana (Escotadura, 1878; Carrasco, 2000 y Rodríguez, 2006) hasta el año 2004, así como por causas naturales (dispersión geoquímica del elemento en los yacimientos previa a su explotación), el mercurio en el municipio de Almadén y sus alrededores se ha dispersado por el medio natural, incorporándose a los suelos, las aguas, la vegetación y la fauna.

1.1. Propiedades físico-químicas del mercurio

El mercurio (Hg) es un metal pesado que a temperatura ambiente se encuentra en fase líquida, presentando un aspecto plateado, brillante y sin olor (Adriano, 1986). Posee tres estados de oxidación: Hg^0 (metálico) Hg^+ (mercurioso) y Hg^{2+} (mercúrico), de los cuales dependerá su comportamiento y propiedades (ANEXO I). Es necesario destacar que el mercurio tiene una enorme dificultad para disolverse en agua ($6 \cdot 10^{-6}$ g/100 ml a 15 °C) ya que su tensión superficial es seis veces mayor que la de ésta. Por ello, los compuestos de mercurio en fase acuosa suelen encontrarse en forma de moléculas no disociadas. Existen como posteriormente veremos, multitud de factores que afectan tanto a la movilidad como a la biodisponibilidad del mercurio, tales como el pH, la materia orgánica, el tipo de suelo y el potencial redox.

En la naturaleza el mercurio se encuentra en diversas formas. Por un lado, se encuentran las especies inorgánicas de Hg (II): cloruro de mercurio (HgCl_2), óxido de mercurio (HgO), hidróxido de mercurio (Hg(OH)_2) y sulfuro de mercurio o cinabrio (HgS). En concreto, el cloruro de mercurio es una sal lo suficientemente volátil como para existir en forma de gas atmosférico. Sin embargo, la reactividad y la solubilidad en agua de estos gases inorgánicos o divalentes, hacen que su deposición en la atmósfera sea mucho más rápida que la del mercurio elemental o metálico (Hg^0). Este hecho hace que la vida atmosférica de los gases del mercurio sea más corta que la del gas de mercurio elemental (Millán y Carrasco, 2008).

Cuando el mercurio se combina con el carbono, forma compuestos orgánicos de metilmercurio (CH_3HgCl y CH_3HgOH) y, en menores proporciones, otros organomercuriales como dimetilmercurio o fenilmercurio (EPA, 1997). El metilmercurio es el compuesto orgánico más frecuente, que generan los microorganismos y procesos naturales a partir de otras formas. Éste puede acumularse (bioacumulación o biomagnificación) en muchos peces de agua dulce y salada comestibles, en concentraciones mucho más

altas que las de las aguas que los rodean. La forma orgánica más tóxica y con mayor poder de biomagnificación que podemos encontrar en el medio ambiente es el monometilmercurio (Craig, 1986; Choi y Bartha, 1994; Grieb *et al.* 1990), ya que su naturaleza facilita su entrada a través de las membranas celulares y la dispersión por órganos y tejidos (Pinho *et al.*, 2002, Storelli y Marcotrigiano, 2002).

1.2. Principales fuentes de liberación del mercurio al medio ambiente

Las principales fuentes de liberación del mercurio al medio ambiente se pueden clasificar en dos grupos:

- **Fuentes naturales:**

La liberación del mercurio al medio es consecuencia de la movilización natural de éste desde la corteza terrestre, resultado de la actividad volcánica y la erosión de las rocas. Por lo tanto, las emisiones naturales de mercurio se encuentran fuera del control humano y deben considerarse como parte del entorno a escala local o global. Aun así, estas emisiones contribuyen a aumentar la concentración de mercurio ambiental que actualmente suponen menos del 50 % de las liberaciones totales (Millán y Carrasco, 2008).

- **Fuentes antropogénicas:**

Gran parte del mercurio que actualmente se encuentra en la atmósfera es consecuencia del desarrollo de actividades antropogénicas (minería de mercurio, combustión de combustibles fósiles, industria química y metalúrgica, etc.). Se cree que estas actividades han multiplicado los niveles generales de mercurio en la atmósfera de 2 a 10 veces en el último siglo (Fernández *et al.*, 2010).

1.3. Ciclo biogeoquímico del mercurio y distribución en el medio ambiente

El mercurio es un metal abundante en la corteza terrestre y aunque su concentración es incierta, se estima en unos $0,5 \text{ mg kg}^{-1}$. Se acumula en grandes bolsas, donde su concentración es muy elevada. De este modo y excluyendo las explotaciones mineras y otras reservas subterráneas, los océanos, son considerados los principales reservorios de mercurio, con alrededor del 10^{17}g de este metal, fundamentalmente en forma de cinabrio (HgS). El suelo y los sedimentos de forma conjunta contienen aproximadamente 10^{13}g ; la biosfera, principalmente la biota terrestre contiene 10^{11}g y por último las aguas terrestres 10^7g (Gaona, 2004).

De forma natural el ciclo biogeoquímico del mercurio sigue una dinámica cíclica, la cual se ve influenciada por las actividades antropogénicas. Se define como un ciclo continuo entre la atmósfera, la tierra y el agua, caracterizado por la gran movilidad que presenta el mercurio entre los diferentes compartimentos ambientales. Esto es debido a que el mercurio por lo general es muy inestable en el medio ambiente ya que está sujeto a reacciones químicas, biológicas y fotoquímicas (Adriano, 1986).

Se tiene conocimiento de la existencia de dos ciclos implicados en el transporte y distribución del mercurio en el medio ambiente. Uno de ellos de ámbito global, donde la circulación atmosférica mueve el vapor de mercurio elemental (Hg^0) de las fuentes terrestres a los océanos. El segundo ciclo es de ámbito local y depende de la metilación del mercurio inorgánico principalmente de las fuentes antropogénicas. Los pasos en este ciclo aún no se conocen muy bien, pero probablemente la acción bacteriana está involucrada en la formación y liberación de metilmercurio a la atmósfera (Millán y Carrasco, 2008). Por lo tanto, los niveles medioambientales de metilmercurio dependen de un balance entre los procesos de metilación y desmetilación bacteriana (Boening, 2000).

El mercurio en forma de mineral de cinabrio es escasamente atacado por los agentes atmosféricos (O_2 , CO_2 y H_2O) y no accede al ciclo del agua. De este modo, la transmisión de este elemento a la cadena trófica es muy reducida por esta vía. Por el contrario, la principal incorporación del mercurio a las cadenas tróficas se produce a través del mercurio (metal), debido a que es volátil a temperatura ambiente, incorporándose a la atmósfera en forma vapor (Hg^0 vapor). Una vez en la atmósfera el vapor de mercurio sufre procesos de oxidación transformándose en Hg^{2+} (soluble) (Antonio y Doadrio, 2004).

El comportamiento del mercurio que se encuentra en los suelos está determinado por procesos físicos y químicos, responsables de la redistribución del elemento en el suelo. Una vez que el mercurio está disuelto en el suelo, predominan las reacciones de adsorción-desorción (Schuster, 1991). A continuación el mercurio puede volatilizarse o transformarse biológica o químicamente (Hogg *et al.*, 1978). La temperatura es un factor fundamental para la volatilización del mercurio (Siegel, 1988, Xia *et al.*, 1991, Lindberg *et al.*, 1979, Millán y Carrasco, 2008). Parte de este mercurio volverá al medio terrestre a través de procesos de deposición seca o húmeda (Ferrara *et al.*, 1991). La deposición seca, es proporcional a los niveles de mercurio en el suelo y la concentración en el aire, mientras que, la deposición húmeda, es proporcional a los porcentajes de emisión química (Constantinou *et al.*, 1995).

Por otro lado, mediante procesos de erosión o lixiviación, el mercurio puede pasar del suelo al agua de los ríos, y del agua y sedimentos al compartimento biótico fluvial mediante procesos de extracción y bioacumulación (Millán y Carrasco, 2008).

En los medios acuáticos el mercurio se encuentra en concentraciones muy bajas, en forma de coloides, partículas minerales o fases disueltas. Las fases disueltas pueden ser atrapadas por sorción en arcillas o hidróxidos. Por otro lado, los compuestos orgánicos presentan gran capacidad de captura de cationes metálicos de mercurio, formando especies tóxicas como es el metilmercurio (Millán y Carrasco, 2008). A continuación se muestra un esquema del ciclo biogeoquímico del mercurio (Fig. 1)

CICLO BIOGEOQUÍMICO DEL MERCURIO

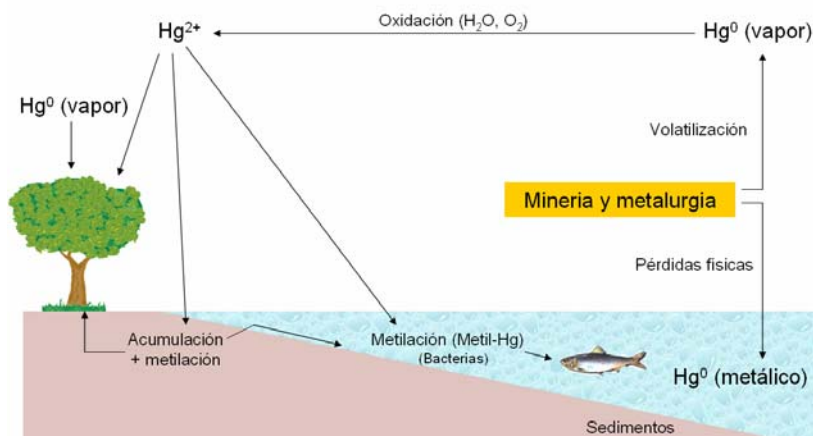


Figura 1. Esquema del ciclo biogeoquímico del mercurio. Fuente: Elaboración propia, basado en: http://www.ucm.es/info/crismine/HTML_Almaden/Almaden_contaminacion_archivos/image016.jpg

1.4. Factores que influyen en la movilidad y biodisponibilidad del mercurio

La movilidad y biodisponibilidad del mercurio, va a estar determinada por una serie de factores físico-químicos entre los que se encuentra: el pH, el potencial redox, los iones cloro, bromo y yodo presentes, así como, los óxidos de Fe y Mn y la materia orgánica (Lindsay, 1979; Andersson, 1979; Schuster, 1991; M.H.D Pestana et al., 2003). Son numerosos los estudios que han demostrado que la adsorción del mercurio depende del pH de la fase acuosa, la presencia de cloruros y la naturaleza del sorbente sólido (Xu y Allard, 1991).

- **pH**

Se ha demostrado que cuando el pH aumenta, el $Hg(OH)_2$ aparece como especie dominante mientras que $Hg(OH)Cl$ aparece como especie en transición y el $HgCl_2$ disminuye (Adriano, 1986). Según Higuera *et al.* (2003) los valores de pH más elevados están relacionados con las mayores concentraciones de mercurio, ya que se ve favorecida la retención de éste en forma de cinabrio (HgS). También se ha comprobado que la estabilidad del mercurio en los suelos se ve influenciada por el pH. De modo que en suelos con calizas o margas a los que se les añade $HgCl_2$, se ve incrementada la reducción de las sales de Hg a Hg^0 y de este modo aumentan a su vez las pérdidas de mercurio por volatilización cuando el pH aumenta de 5,3 a 6,4 (Frear y Dills, 1967). También la adsorción del mercurio por minerales de la arcilla esta condicionada por el pH. Según Fraah y Pickering (1978) la adsorción de mercurio por la illita y la caolinita oscila con el pH. A $pH > 7,8$ se favorecen las cargas negativas en superficie y se absorben cationes.

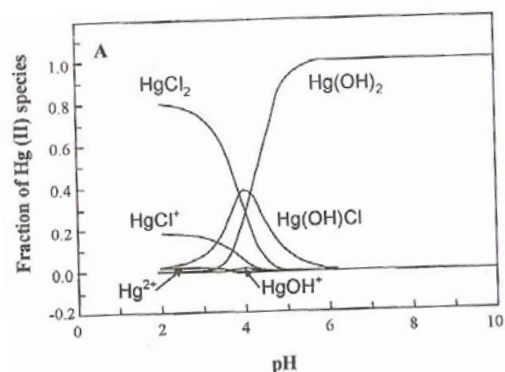


Figura 2. Especiación del Hg (II) en suelos en función del pH. Fuente: Adriano, 1986

Otro factor importante a tener en cuenta del mercurio es su complejación con el carbono orgánico disuelto, cuya concentración se incrementa cuando el pH también los hace (Kendorff y Schnitzer, 1990).

- **Potencial redox**

El grado de aireación también influye en la estabilidad del mercurio en suelos y sedimentos. En condiciones naturales de potencial redox (Eh) y pH, la solubilidad del mercurio está principalmente determinada por $\text{Hg}(\text{OH})_2$, Hg^0 y HgS (Millán y Carrasco, 2008). En condiciones moderadas de oxidación por encima de pH 5, la especie dominante del mercurio en solución es el Hg^0 disociado. Si nos encontramos ante condiciones ligeramente reductoras el mercurio puede precipitar como sulfuro (HgS). El HgS tiene una solubilidad muy baja, sin embargo, en condiciones de reducción muy fuertes, su solubilidad aumenta por conversión del ión mercúrico a metal libre o por existencia de HgS^{2-} estable a pH elevados (Wollast *et al.*, 1975). En los sedimentos se necesitan condiciones reductoras para la óptima formación de metilmercurio. Las pérdidas en los suelos de metilmercurio serán mayores en condiciones aerobias que anaerobias (Rogers, 1976). Altos grados de solubilidad del mercurio sólo se producen en ambientes muy oxigenados (350 a mv), éste es el resultado de la fuerte tendencia del $\text{Hg}(\text{II})$ a asociarse con hidróxidos e iones cloruro.

- **Tipo de suelo y materia orgánica**

El tipo de suelo va a ser un factor fundamental a la hora de determinar el comportamiento del mercurio (Heeraman, *et al.*, 2001). Por lo general, el mercurio se acumula en los horizontes superficiales del suelo, aunque pueden existir excepciones. De este modo, la concentración de mercurio disminuye poco a poco en los primeros 20 cm de suelo, para luego estabilizarse con la profundidad (Millán y Carrasco, 2008). Es importante tener en cuenta las precipitaciones ya que como se comprobó en estudios realizados por Mateilainen *et al.* (2001) éstas ocasionaron una disminución de la concentración de mercurio en la capa orgánica superficial y un aumento en las capas más profundas, como resultado de procesos de lixiviación.

El mercurio presenta una gran afinidad por la materia orgánica, debido a los grupos funcionales $-\text{S}$ (electronegativos) que contienen las moléculas orgánicas. De este modo, la concentración de mercurio en solución presente en un suelo está controlada por las reacciones de adsorción-desorción con la materia orgánica y los minerales de éste (Schuster, 1991).

Por su parte, Warren *et al.* (1966) publicó que las muestras de suelo tomadas en horizontes con altos niveles de materia orgánica y arcillas contenían por lo general altas cantidades de mercurio. Según Landa (1978) las pérdidas de mercurio del suelo por volatilización eran menores si éstos presentaban cierto contenido en materia orgánica. Este efecto se puede atribuir a la adsorción del mercurio por la materia orgánica y la arcilla. En 1979 Andersson, comprobó que en suelos ácidos ($\text{pH} < 4$) la materia orgánica actuaba como mejor sorbente,

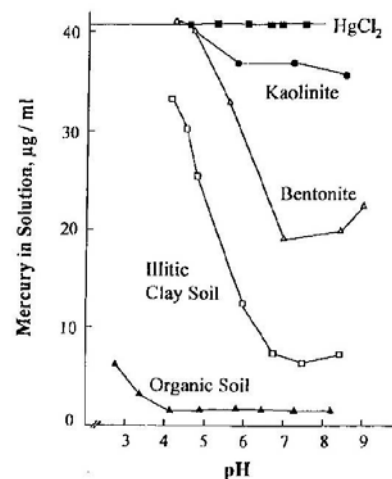


Figura 3. Retención de mercurio en suelos y componentes del suelo en función del pH.

Fuente: Adriano, 1986

mientras que en suelos alcalinos o calcáreos a niveles mayores de pH ($\text{pH} > 5,5$) los minerales de la arcilla adquieren una mayor importancia ya que la materia orgánica se satura con Ca^{2+} .

Fang (1978) observó que la mineralogía de las arcillas también es determinante en la sorción del mercurio en el suelo, siendo la illita la que mayor capacidad de sorción presenta frente a la caolinita que es la que menos (Fig. 3).

1.5. Transferencia suelo- planta del mercurio

La acumulación y toxicidad del mercurio es mucho más baja en los ecosistemas terrestres que en los acuáticos. Esto es debido a que en el suelo hay diversos agentes que pueden contribuir a su inmovilización. Por una parte, el mercurio puede ser secuestrado por los componentes del propio suelo, pero por otra también puede ser inmovilizado por los microorganismos edáficos o extraído por los sistemas radicales de las plantas y transferidos al interior de las mismas. La transferencia del mercurio a la planta a través de las raíces es muy lenta y no depende de la concentración del mercurio total presente, si no de cantidad de mercurio fácilmente disponible.

Cada especie vegetal presenta unas características propias que van a determinar su interacción con el suelo y su capacidad de supervivencia en unas determinadas condiciones ambientales. Para que tenga lugar la transferencia de los metales pesados presentes en el suelo, es necesario que la planta sea capaz de absorber el metal. Exceptuando aquellos elementos que participan en intercambios gaseosos (CO_2 , H_2O), el resto se absorbe principalmente por la raíz, junto con el agua, en forma de cationes o aniones (Esteban, E., 2008).

La producción de biomasa de una especie vegetal es uno de los puntos clave en la evaluación de la transferencia suelo-planta del elemento tóxico. El potencial fitoextractor de un vegetal no sólo depende de su capacidad fijadora del metal pesado relativo a su masa, sino también a la cantidad de biomasa que es capaz de producir durante su vida, así como al ritmo al que lo hace. En general, las plantas hortícolas o herbáceas son de crecimiento más rápido que las especies arbustivas o arbóreas, aunque éstas últimas pueden alcanzar valores elevados de biomasa. Otro factor importante es la resistencia de las distintas especies a la presencia del elemento tóxico en el medio de crecimiento. De modo que, aquellas plantas que sufran menores reducciones de biomasa en respuesta a dosis crecientes de elemento tóxico serán más adecuadas para utilizarse en fitorrecuperación (Esteban, E., 2008)

Otro concepto importante a tener en cuenta es el denominado factor de transferencia o factor de bioacumulación (BAF), que expresa la relación entre la concentración de elemento en planta y la concentración de elemento fácilmente disponible en suelo. La existencia de niveles altos de mercurio fácilmente disponible en suelo, pueden resultar fitotóxicos, provocando efectos que pueden ir desde la muerte del ejemplar hasta efectos de carácter subletal (disminución del crecimiento, senescencia, disminución del contenido de clorofila, etc. (U.S EPA, 1997). De este modo, tanto la fotosíntesis, la transpiración foliar, y la toma de agua se ve reducida ante exposiciones altas de mercurio. (Boening, 2000).

2. DESCRIPCIÓN DEL ÁREA DE ESTUDIO.

2.1. Marco geográfico del área de estudio

El área de estudio forma parte del denominado distrito minero de Almadén, el cual se localiza al SO de la provincia de Ciudad Real dentro de la Comunidad Autónoma de Castilla La Mancha, y cercano al límite con las provincias de Badajoz (al oeste) y de Córdoba (al sur) (Fig. 4).



En concreto, los puntos de muestreo establecidos se encuentran ubicados en las proximidades de la antigua Estación de ferrocarril de Chillón en la ribera del río Valdeazogues a unos 10 km del municipio de Chillón (Fig.5)



Esta antigua estación de ferrocarril, en estos momentos abandonada, fue utilizada como lugar de descarga y transporte de parte del mineral extraído en las distintas minas del distrito de Almadén (Schimid, *et al.* 2005).

El río Valdezogues es el principal curso fluvial que atraviesa el distrito minero de Almadén, en el que desembocan sus aguas numerosos arroyos. Éste es un hecho importante a tener en cuenta, ya que el río transita muy próximo (e incluso atraviesa) a explotaciones mineras importantes (ejemplo: Mina de El Entredicho), pudiendo arrastrar aguas abajo sedimentos con altas concentraciones de mercurio.

2.2. Marco climático del área de estudio

La zona de estudio se caracteriza por presentar un clima mediterráneo semiárido y moderado, con inviernos húmedos y fríos, y veranos secos y templados. El balance hídrico en esta región presenta un exceso de agua en invierno y una falta de precipitaciones en verano. Según datos recogidos a lo largo de 30 años en la estación meteorológica de las Minas de Almadén (Carrasco *et al.*, 2001, Schmid *et al.*, 2003), la media anual de temperatura es de 16 °C y la precipitación media anual de 587 mm.

La evapotranspiración anual es de 963 mm presentado un incremento en los meses de verano. Este hecho es importante a la hora de cuantificar las reservas de agua de un suelo, de este modo las reservas disminuirán en verano y el suelo permanecerá seco hasta la llegada de las lluvias otoñales, correspondiéndose con un régimen de humedad xérico (Soil Survey Staff, 1999).

A continuación se muestran los climogramas correspondientes a los años 2007 y 2008 de la estación meteorológica de las Minas de Almadén (Código: 4300, UTM X 339863, UTM Y 4293402, Altitud: 535 m) (Fig. 6)

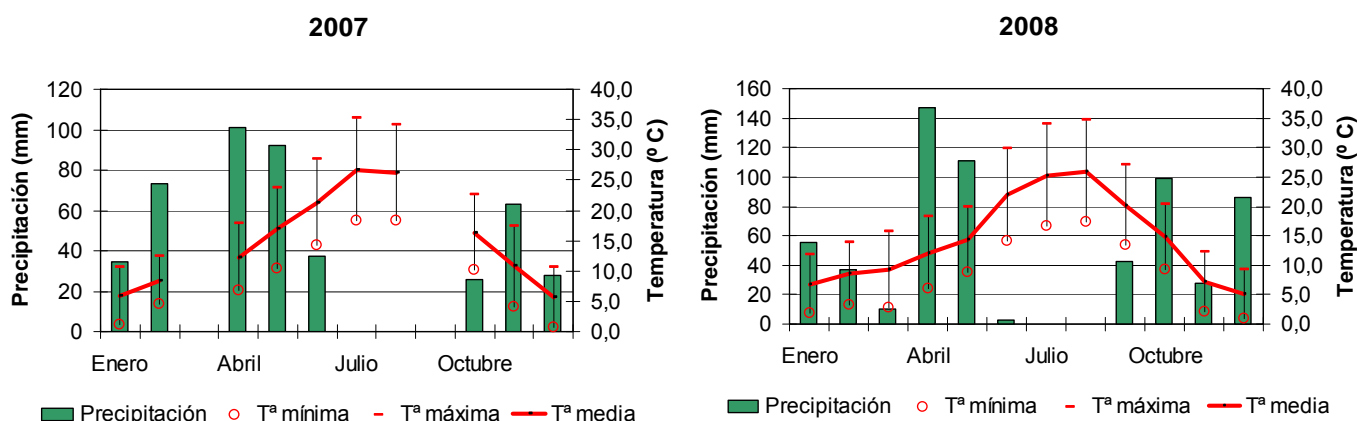


Figura 6. Climogramas de los años 2007 y 2008 de las minas de Almadén Fuente: Estación meteorológica de las Minas de Almadén (Ciudad Real)

2.3. Marco geológico del área de estudio

El distrito minero de Almadén forma parte del sector meridional de la zona Centroibérica del macizo hercínico. El yacimiento se formó hace unos 370 millones de años y se caracteriza por presentar una sucesión paleozoica fundamentalmente detrítica, afectada por deformaciones tectónicas propias de la orogenia Hercínica. Todo ello dio lugar a la formación geológica de dirección Este-Oeste conocida como sinclinal de Almadén, formado por areniscas, cuarcitas y pizarras. También se encuentran de forma intercalada con estas rocas, materiales volcánicos, en forma de diques y sills (Higueras *et al.*, 2000) (Fig. 7)

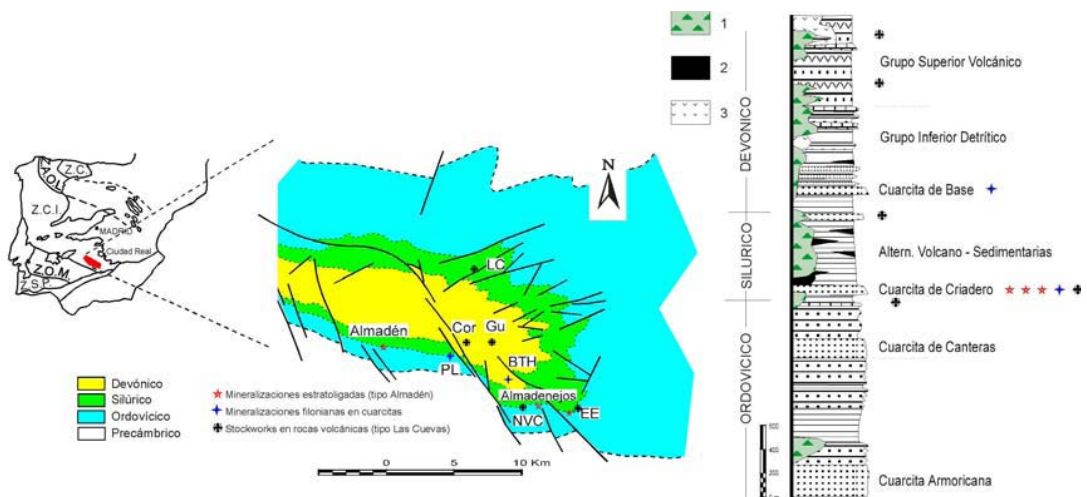


Figura 7. Localización, esquema geológico y columna estratigráfica del Sinclinal de Almadén, indicando la localización de las principales mineralizaciones de mercurio Fuente: Higueras *et al.* 2007

En este distrito minero ha habido varias explotaciones mineras, entre las que se encuentran las minas de Almadén, Las Cuevas, El Entredicho, La Vieja Concepción, la Nueva Concepción, Guadalperal, etc. (ANEXO II). En todas ellas los yacimientos son prácticamente monometálicos (Hernández, 1985; Fernández, 2010).

En concreto, el área de estudio se caracteriza por ser una zona de margen de ribera, que incluso estacionalmente puede inundarse, presentando un suelo con una textura areno-margarcillosa, de la cual el 35 % es arcilla, el 15 % limo y el 50 % restante arenas (Schimid *et al.* 2005)

2.4. Marco florístico del área de estudio

En el área de estudio la principal especie leñosa es la adelfa (*Nerium oleander*). En dicha zona, los ejemplares de adelfa alcanzan grandes portes y edades. De forma esporádica podemos encontrar pequeñas masas de enea (*Typha dominguensis*) y carrizo (*Phragmites australis*), cuyos rizomas se extienden gradualmente tomando ventaja y abriéndose paso para después desplazar de la zona a otros hidrófilos. La degradación de las comunidades originales es debido también a pequeñas plantaciones de eucaliptos (*Eucalyptus camaldulensis*). También son comunes fresnos (*Fraxinus angustifolia*), y tarays (*Tamarix sp.*).

3. DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA EN ESTUDIO: ADELFA (*Nerium oleander* L.).

La adelfa (*Nerium oleander* L.), es un arbusto perenne de la familia *Apocynaceae*, que alcanza una altura aproximada de hasta 6 m y una extensión de 2,5-4,5 m. Se caracteriza por tener un tronco recto y robusto, de corteza lisa pardo-grisácea. Sus hojas son enteras opuestas o verticiladas y lanceoladas.

Florece en verano, presentando grandes flores de color rosa intenso o blanco, agrupadas en racimos en el extremo de los brotes del año. Los frutos son alargados, con una cubierta endurecida y con forma de vaina que contiene unas semillas alargadas y peludas en el extremo (Fig. 8).

Es una especie tóxica en todas sus partes (hojas, tallos, raíz, etc.) condición que la excluye de ser utilizada para forraje de ganado, etc.

Es común en zonas de clima templado mediterráneo. Crece en suelos bien drenados, barrancos, áreas abiertas y a lo largo de cursos de agua desde el nivel del mar hasta los 600 m de altitud. Como especie introducida, crece en jardines y es utilizada comúnmente como planta ornamental.

Este hecho, convierte a *Nerium oleander* en un especie importante en el ecosistema de ribera, aumentando su biodiversidad, fijando el suelo aledaño a los cursos fluviales y en general protegiendo las cuencas hidrográficas de su degradación.



Figura 8. Detalle de un ejemplar de adelfa (*Nerium oleander*). Fuente: Real Jardín Botánico de Madrid.

Originariamente la distribución del *Nerium oleander* era amplia ya que cubría las riberas de la cuenca del Mar Mediterráneo y de Oriente Medio. Dentro de la Península Ibérica su distribución se centraba al Sur y Este peninsular (Fig. 9).

Según estudios realizados con *Nerium oleander*, ésta puede ser considerada como una especie vegetal monitorizadora de contaminación por metales pesados, habiendo sido utilizada en numerosas investigaciones con el fin de estudiar la distribución de metales pesados en el suelo en varios países (Seaward y Mashour, 1991; Sawidis *et al.*, 1995; Öztürk y Aksoy, A. 1997).



Figura 9. Mapa de distribución de la adelfa (*Nerium oleander*)

Fuente: <http://www.fut.es/~ralturo/arbre/apocyna/neoimap.jpg>

4. OBJETIVOS DEL PROYECTO.

Los principales objetivos del trabajo desarrollado en la Unidad de Degradación en Suelos del departamento de Medio Ambiente del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) se centran en:

- Caracterización físico-química del suelo: determinación del pH, Conductividad eléctrica y materia orgánica.
- Determinación del mercurio total y fácilmente disponible para las plantas en el suelo.
- Estudio de la absorción y distribución del mercurio en *Nerium oleander* y evaluación de la transferencia de mercurio en el sistema suelo-planta.
- Determinación de la deposición superficial de mercurio sobre las hojas de adelfa, como consecuencia de la contaminación atmosférica.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.

El procedimiento experimental llevado a cabo consta de diversas etapas, que van desde la preparación y acondicionamiento de las muestras de suelo y planta (hojas, tallos y frutos) recogidas en las proximidades de la Estación de Ferrocarril de Chillón (Ciudad Real), hasta la caracterización físico-química de las muestras de suelo y análisis de la concentración total de mercurio en suelo y planta, así como de la determinación del mercurio fácilmente disponible en el suelo.

5.1. Recogida de muestras.

Las muestras tanto de suelo como de planta fueron recogidas en seis puntos establecidos dentro del área de estudio. Los puntos elegidos quedaron marcados y fijados mediante el registro de su posición con GPS, con el fin de identificar de forma exacta dichos puntos en futuros muestreos (Fig. 10). Las muestras sometidas a estudio corresponden con las recogidas durante el mes de noviembre del año 2007 y 2008. Las muestras de adelfa fueron tomadas tanto en el año 2007 como 2008 del mismo individuo para cada uno de los 6 puntos.

Estas muestras de suelo y planta fueron guardadas en bolsas de plástico y sobres de papel, respectivamente, etiquetadas y transportadas al laboratorio para su posterior acondicionamiento y análisis. Las muestras vegetales contenían hojas y tallos, y en casi todos los casos también frutos.

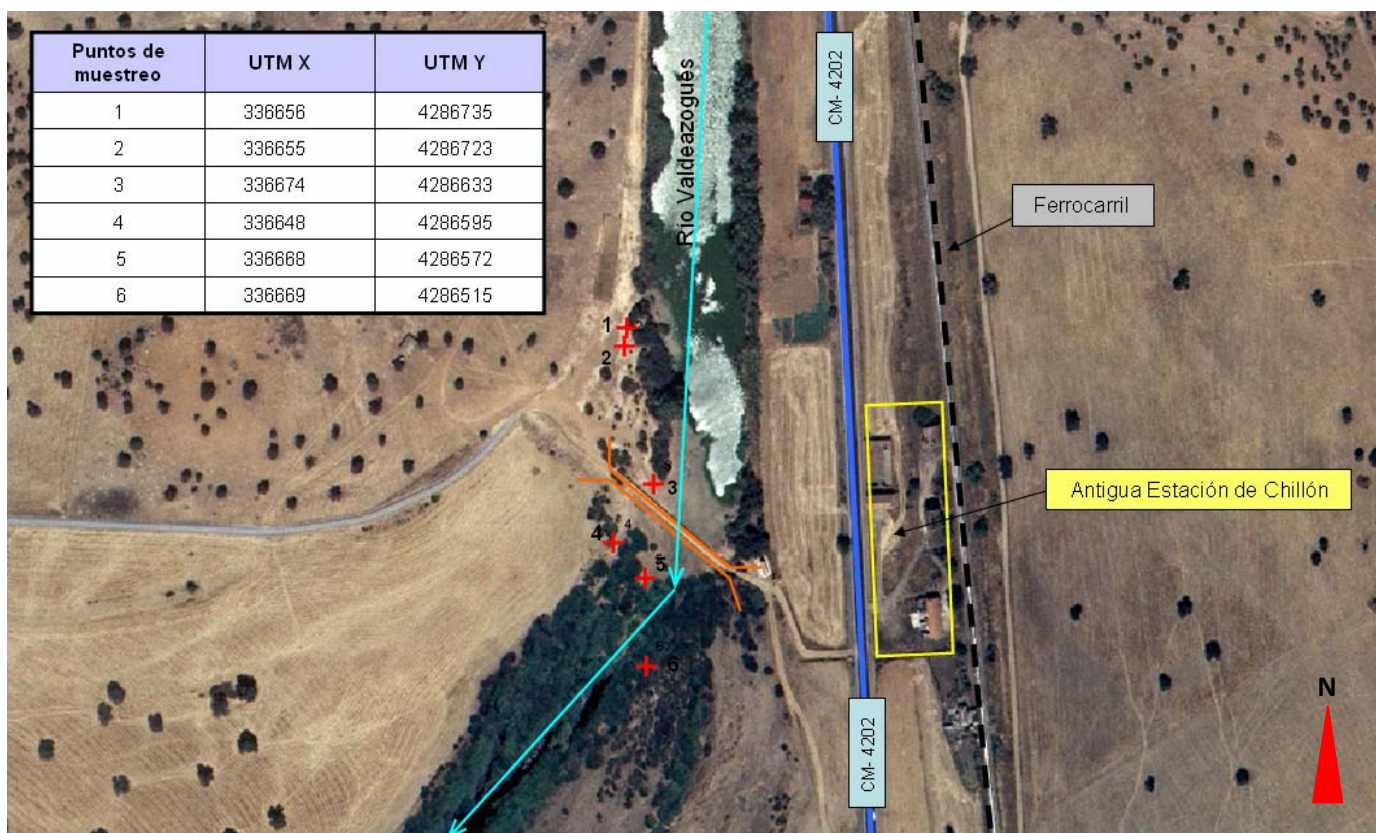


Figura 10. Foto aérea de la zona de estudio y coordenadas GPS de los puntos de muestreo. Fuente: <http://www.sigpac.com>

5.2. Preparación y acondicionamiento de las muestras de suelo.

Las muestras de suelo al igual que las de planta deben ser acondicionadas de forma previa. En este caso las muestras de suelo incluyen el denominado suelo bulk (suelo no adherido a las raíces), tomado bajo el ejemplar de Adelfa seleccionado para el muestreo. La preparación de las muestras comienza con el secado al aire durante varios días de las mismas. A continuación, los suelos secos son tamizados hasta alcanzar tamaños menores de 2 mm. Y por último, una parte de la muestra de suelo es molida con un mortero para obtener una muestra homogénea y fina.

5.3. Caracterización físico-química del suelo.

Con el fin de llevar a cabo la caracterización físico-química del suelo, se determinó el pH, la conductividad eléctrica (CE) y el porcentaje de materia orgánica.

- **Medida del pH**

La determinación del pH de las muestras de suelo se lleva a cabo mediante los métodos oficiales (Norma UNE 77305), a través de la medida de este parámetro en agua o en disolución 0,1 M de KCl, utilizando un pH-metro. (ANEXO III)

- **Medida de la conductividad eléctrica**

La medida de la conductividad eléctrica (CE) de los extractos obtenidos de un suelo permite establecer una estimación aproximadamente cuantitativa de la cantidad de sales que contiene. En este caso, para ello se utilizó un conductímetro (Crison EC-Meter Basic 30⁺). (ANEXO IV).

- **Determinación de la materia orgánica del suelo por oxidación (Método *Walkey-Black*)**

La materia orgánica de una muestra de suelo se determina aplicando el método de *Walkey-Black*, que consiste en una oxidación previa de la materia orgánica del suelo con dicromato potásico 1N, en medio ácido, seguido de una valoración del exceso de éste con sulfato ferroso amónico (Sal de Möhr). (ANEXO V).

5.4. Preparación y acondicionamiento de las muestras de Adelfa.

Previo al estudio de las muestras es necesario la preparación y acondicionamiento de las mismas. Para ello, en este caso se procede a la pesada del contenido de cada uno de los sobres con una balanza, con el fin de averiguar el peso total de cada muestra.

Seguidamente se separan las distintas partes de la planta (hojas, tallos y frutos) y se pesan por separado. A continuación, cada fracción se coloca en un vaso de precipitados y se lava con agua destilada en un baño de ultrasonidos en cuatro ciclos sucesivos de 10 minutos cada uno, cambiando el agua cada vez con el fin de asegurar la limpieza completa. Con esta etapa de lavado conseguiremos eliminar el mercurio que pudiera estar adherido a la superficie de la planta. Una vez lavadas las distintas fracciones se dejan secar a temperatura ambiente durante varios días y finalmente una vez secas se procede a su molienda con ayuda de un molinillo o mortero.

Previo al lavado de los ejemplares de adelfa recogidos, se seleccionará una parte de cada una de las fracciones de las hojas que no será lavada, con el fin de poder analizar la cantidad de mercurio que queda adherida a la planta y no ha sido absorbido del suelo a través de los sistemas radicales.

5.5. Medida de la concentración total de mercurio en suelo y planta.

Tras la preparación y acondicionamiento de las distintas muestras de suelo y planta se llevan a cabo las medidas de concentración de mercurio total en cada sistema.

Para ello, se utiliza un equipo específico, el analizador AMA (Analizador Avanzado de Mercurio). Se trata de un espectrómetro de absorción atómica planteado para la determinación de mercurio en muestras

sólidas o líquidas sin tratamientos previos. Emplea la técnica de generación de vapor de mercurio, independientemente de la matriz. (ANEXO VI).

5.6. Determinación del mercurio fácilmente disponible en el suelo.

Entre los métodos para la determinación de los elementos fácilmente disponibles del suelo se encuentra el método Soltanpour *et al.* 1977, aunque también pueden obtenerse a través de las dos primeras etapas de la extracción secuencial desarrollada para el mercurio y específicamente enfocada al suelo de Almadén propuesta por Sánchez *et al.* (2005). Los valores obtenidos por ambos métodos son comparables según Fernández *et al.* (2010). Lucena *et al.* 1993, en estudios realizados ha demostrado la existencia de una buena correlación entre el mercurio extraído con AB-DTPA (Soltanpour, 1977) y el mercurio en planta (Lucena *et al.* 1993) (ANEXO VII). En este estudio se eligió la segunda opción a la hora de determinar el mercurio fácilmente disponible en el suelo.

5.7. Validación de los resultados dados por el AMA 254

Con el fin de cerciorarnos que el equipo de análisis avanzado de mercurio (AMA 254) está llevando a cabo las medidas correctamente, es necesario realizar un control de la calidad de éstas y para ello debemos aplicar unos patrones sólidos (suelo, vegetal y polvo de leche) certificados por el BCR (Community Bureau of Reference actualmente llamado Standard Measurements and Testing), que garantizan una concentración conocida de elemento problema en la muestra así como una homogeneidad en el preparado de la misma, por lo que permite poder realizar repeticiones exactas de la medida. A continuación se muestra la concentración exacta de mercurio total que contiene cada uno de los patrones y el valor obtenido por el analizador avanzado de mercurio (AMA 254) (Tabla 1).

Patrón	Valor certificado Hg _{TOTAL}	Valor AMA 254 Hg _{TOTAL} (2010)
SRM 2709 (mg kg ⁻¹)	1,40 ± 0,08	1,346 ± 0,042
BCR-CRM 150 (µg kg ⁻¹)	9,4 ± 1,7	9,5 ± 0,1
BCR-CRM 151 (mg kg ⁻¹)	0,101 ± 0,010	0,098 ± 0,003
SRM 1573A (mg kg ⁻¹)	0,034 ± 0,004	0,037 ± 0,000

Tabla 1. Valor certificado de patrón contrastado con valor obtenido en AMA 254

Con el fin de mantener el equipo en perfectas condiciones, se realizaron calibrados periódicos utilizando para ello soluciones acuosas de mercurio de concentración conocida preparadas por el laboratorio de referencia de Química Analítica del CIEMAT.

6. PROCEDIMIENTO ESTADÍSTICO.

Una vez establecidos los procedimientos experimentales, se procedió al diseño del estudio estadístico al que posteriormente serían sometidos los resultados obtenidos tras el análisis de las muestras (ANEXO VIII). El programa estadístico utilizado fue el software SPSS Statistics 17.0.

7. RESULTADOS.

7.1. Caracterización físico-química del suelo

El resultado de la medida de pH, conductividad eléctrica (CE) y porcentaje de materia orgánica de las 6 muestras de suelo bulk tomadas en la zona de estudio durante los años 2007 y 2008 se muestran en la Tabla 2.

Parcela	Muestra	Fecha	Temperatura (°C)	pH (1:2,5)	CE (mS cm ⁻¹) (1:2,5)	CE (mS cm ⁻¹) (1:5)	% (M.O)
R1	1	Nov-07	25,5	5,8	1,84	0,95	6,1
R1	2	Nov-07	25,5	6,3	0,75	0,43	8,2
R1	3	Nov-07	25,5	6,2	0,56	0,33	6,8
R1	4	Nov-07	25,5	6,5	0,54	0,27	6,7
R1	5	Nov-07	25,5	6,5	0,93	0,51	6,6
R1	6	Nov-07	25,5	6,2	0,50	0,28	5,8
R1	1	Nov-08	25,6	6,4	0,40	0,21	5,4
R1	2	Nov-08	25,6	5,7	1,16	0,63	7,2
R1	3	Nov-08	25,6	5,5	1,47	0,85	7,6
R1	4	Nov-08	25,6	5,5	1,27	0,66	6,4
R1	5	Nov-08	25,6	6,2	0,62	0,32	6,4
R1	6	Nov-08	25,6	5,8	1,01	0,53	6,8

Tabla 2. Resultado de la medida de pH, CE, temperatura y % de materia orgánica de los suelos bulk muestreados.

A la vista de los resultados obtenidos podemos decir que estamos ante un suelo que presenta unos valores de pH entre 5,5-6,5, clasificados según Porta *et al.* 1999 , como medianamente ácidos o ligeramente ácidos, por lo que es esperable que la disponibilidad de los nutrientes sea máxima.

Otro parámetro analizado es la conductividad eléctrica (1:2,5), en este caso vemos como en la tabla 2 los valores obtenidos en cada uno de los puntos de ambos años no superan los 2 mS cm⁻¹, por lo que son clasificados por Schoenberger *et al.* 2002, como no salinos. Esto está relacionado con la cantidad de sales disueltas (sulfatos) procedentes de la litología y de las actividades antropogénicas (Schmid *et al.*, 2005).

En zonas semiáridas, como es el caso del área de Almadén valores de materia orgánica en suelo por encima de 3% son considerados como elevados (Schoenberger *et al.*, 2002). En este caso, el porcentaje de materia orgánica obtenido se encuentra entre 5,4 y 8,2. Debemos tener en cuenta que el área de estudio se trata de una zona de ribera, la cual puede verse favorecida por las condiciones de humedad, presencia de vegetación, condiciones del suelo, etc. (Schimid *et al.*, 2005).

7.2. Concentración total de mercurio en suelo.

Los valores de concentración obtenidos en los distintos puntos de muestreo de mercurio total en el suelo son altos, oscilando en un rango que va desde $116,7 \pm 24,3$ y $350,9 \pm 68,6$ mg kg^{-1} (Tabla 3) y que se corresponde con los niveles geológicos de la zona más los antropogénicos que en una región, como Almadén con abundantes depósitos ricos en mercurio y sujeta a una intensa y prolongada actividad minera, deberán ser normales (Higuera *et al.* 2003, y Gray *et al.* 2004). Estudios realizados por Schmid *et al.* (2005) muestran valores similares de $[\text{Hg}]_{\text{total}}$ en suelo en la zona de estudio (Parcela 1= 146 ± 13 mg kg^{-1} de Hg). Si comparamos con otros estudios en zonas de Almadén (Schimid, *et al.* 2005), las concentraciones de Hg_{total} en suelo alcanzadas en esta zona son moderadamente altas. Otros estudios realizados muestran como los valores de concentraciones de Hg_{total} en suelo en el distrito de Almadén pueden oscilar en un rango de entre 5 - 1770 mg kg^{-1} de mercurio total, encontrándose los valores más altos en aquellas zonas próximas a los antiguos puntos de extracción del mineral, escombreras y zonas metalúrgicas (Schimid, *et al.* 2005).

Parcela	Muestra	Fecha	[Hg] total (mg kg^{-1})	[Hg] fácilmente disponible (mg kg^{-1})	% [Hg] fácilmente disponible con respecto [Hg] total
R1	1	Nov-07	$158,7 \pm 56,6$	$0,039 \pm 0,001$	0,025
R1	2	Nov-07	$245,5 \pm 59,6$	$0,105 \pm 0,000$	0,042
R1	3	Nov-07	$206,0 \pm 25,3$	$0,130 \pm 0,009$	0,063
R1	4	Nov-07	$116,7 \pm 24,3$	$0,020 \pm 0,002$	0,017
R1	5	Nov-07	$164,1 \pm 41,7$	$0,055 \pm 0,009$	0,033
R1	6	Nov-07	$186,8 \pm 35,0$	$0,045 \pm 0,001$	0,024
R1	1	Nov-08	$211,3 \pm 27,3$	$0,017 \pm 0,000$	0,008
R1	2	Nov-08	$167,5 \pm 9,9$	$0,112 \pm 0,015$	0,067
R1	3	Nov-08	$155,2 \pm 14,2$	$0,257 \pm 0,015$	0,166
R1	4	Nov-08	$119,1 \pm 11,9$	$0,089 \pm 0,005$	0,067
R1	5	Nov-08	$147,6 \pm 23,8$	$0,074 \pm 0,009$	0,050
R1	6	Nov-08	$350,9 \pm 68,6$	$0,199 \pm 0,003$	0,057

Tabla 3. Concentración de mercurio total y mercurio asimilable en suelo bulk

Sin embargo, aunque la concentración de Hg_{total} es alta, la fracción fácilmente disponible (soluble + intercambiable) es muy baja alcanzando valores que van $0,257 \pm 0,015$ hasta $0,017 \pm 0,000$ mg kg^{-1} de Hg, suponiendo menos del 0,16 % de la concentración total medido directamente de la muestra de suelo. El hecho de que la concentración de mercurio fácilmente disponible sea tan baja frente a la concentración de Hg_{total} , permite el desarrollo normal de la planta, sin mostrar síntomas de toxicidad frente al elemento. Además, que la concentración de mercurio soluble sea también tan baja ($0,037 \pm 0,013$ mg kg^{-1} a $0,004 \pm$

0,000 mg kg⁻¹ de Hg), asegura que los procesos de lixiviación y transporte de mercurio a las aguas superficiales y subterráneas sean muy reducidos, limitando de alguna modo los riesgos sanitarios y medioambientales que ello conllevaría.

Con el fin de determinar si existían diferencias significativas en la concentración de Hg_{total} en el suelo entre los años 2007 y 2008, se procedió a la realización de un estudio de comparación de medias ANOVA de un factor, tomando como variable dependiente la concentración de Hg_{total} en suelo. Los resultados del análisis muestran que no existen diferencias significativas entre la concentración de mercurio total en suelo entre los años 2007 y 2008 (*Sig.*= 0,695, α = 0,05). El gráfico 1 muestra como las medianas en ambos años son muy similares, aunque la dispersión es mayor en el año 2007 que en el año 2008.

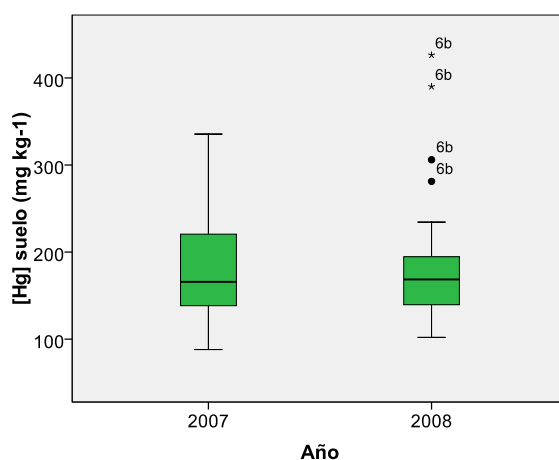


Gráfico 1: Diagrama de cajas de la concentración de Hg_{total} en suelo en 2007 y 2008

7.3. Concentración de mercurio total en planta y su distribución en los tejidos

Para determinar si existían diferencias significativas en la concentración de Hg_{total} en cada fracción de la planta (hoja, tallo y fruto) entre el año 2007 y 2008 se llevó a cabo un estudio de comparación de medias, tomando como variables dependientes la [Hg] en hoja, en tallo y en fruto y como factor, el año. Puesto que el nivel crítico obtenido en el contraste de *Levene* sobre igualdad de varianzas fue muy pequeño ([Hg] en hoja *Sig.*= 0,000, con α =0,05, [Hg] en tallo *Sig.*= 0,005 con α =0,05 y [Hg] en fruto *Sig.*= 0,002, con α =0,05), se rechazó la hipótesis de igualdad de varianzas y se concluyó que, las varianzas de la variable [Hg] hoja, tallo y fruto y no eran iguales. Al no poder asumir igualdad de varianzas en hoja, tallo y fruto se recurrió al estadístico de Welch. Puesto que el nivel crítico (*Sig.*) asociado al estadístico de Welch en el caso de la [Hg] en hoja y en tallo fue menor que 0,05, podemos concluir que existe evidencia estadística de que la concentración de Hg_{total} en hoja y tallo en 2007 y 2008 no son iguales. En el caso del la [Hg] en fruto sin embargo, el nivel crítico obtenido fue de 0,095 con α =0,05, por lo que se concluyó que, la concentración de mercurio no presenta diferencias significativas entre el año 2007 y el año 2008 (Tabla 4).

		Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
[Hg] en Hoja	Welch	72,438	1	37,891	0,000
[Hg] en tallo	Welch	11,962	1	56,329	0,001
[Hg] en fruto	Welch	3,013	1	24,138	0,095

Tabla 4. Pruebas robustas de igualdad de medias de la [Hg] en hoja, tallo y fruto en los años 2007 y 2008. a. Distribuidos en F asintóticamente.

El gráfico 2 muestra como la concentración de mercurio en hoja, es mayor en el año 2007 que en el año 2008. Para determinar si existían diferencias significativas entre la concentración de Hg_{total} en hoja correspondiente a los puntos de muestreo de 2007 con respecto a sus homólogos en 2008, se recurrió a una prueba T-student para muestras independientes con cada pareja de valores de [Hg]. Obteniendo en todos los casos valores críticos por debajo de 0,05, por lo que concluimos que existe evidencia estadística de que la concentración total de mercurio en hoja en cada punto ha variado de 2007 a 2008 de forma significativa.

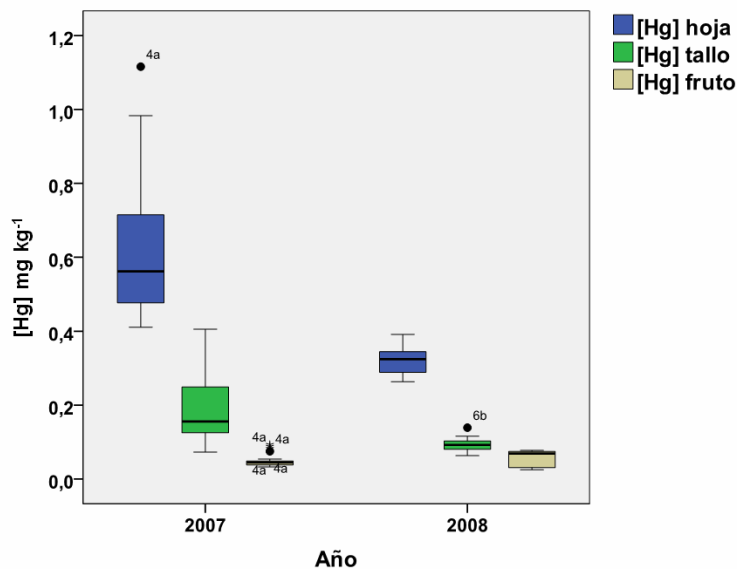


Gráfico 2. Diagrama de cajas de la concentración de Hg total ($mg\ kg^{-1}$) en planta en el 2007 y 2008

En el caso de la $[Hg]_{total}$ en tallo, con el fin de determinar igualmente, si existían diferencias significativas entre la concentración de Hg_{total} en tallo correspondiente a los puntos de muestreo de 2007 con respecto a sus homólogos en 2008 se utilizó a una prueba T-student para muestras independientes con cada pareja de valores de $[Hg]_{total}$ homólogos de cada año. Obteniendo en todos los casos, valores críticos por debajo de 0,05 (exceptuando el punto de muestreo 2 Sig.=0,505, con $\alpha=0,05$), por lo que concluimos que existe evidencia estadística de que la $[Hg]_{total}$ en tallo en cada punto es mayor significativamente en 2007 con respecto a 2008.

En lo que respecta a la distribución del [Hg] dentro de la planta, los resultados muestran tanto en el año 2007 como 2008, que la concentración de Hg_{total} es mayor en las hojas, seguido de los tallos y los frutos

(Gráfico 2). A la vista de estos resultados y con el fin de evaluar si existían diferencias significativas en la concentración de Hg_{total} en cada una de las partes de la planta (hoja, tallo y fruto), se llevó a cabo un estudio de comparación de medias a través del estadístico de Welch ya que no existía igualdad de varianzas, acompañado de sus correspondientes pruebas *post Hoc* (test de Games-Howell), tomando como variables la [Hg] en planta y como factor las partes de la planta (Hoja, tallo y fruto) para cada año. Los análisis estadísticos muestran que existen diferencias significativas tanto dentro del año 2007 como del año 2008, entre la concentración de mercurio en hoja, tallo y fruto (Tabla 5).

[Hg] en planta	Año		Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
	2007	Welch	356.404	2	60.300	0,000
	2008	Welch	499,696	2	57,859	0,000

Tabla 5. Pruebas robustas de igualdad de medias de la [Hg] en planta en 2007 y 2008. a. Distribuidos en F asintóticamente.

Estos resultados nos permiten concluir, acorde con el test de Games-Howell ($Sig.= 0,000$, $\alpha=0,05$ en todos los casos), que la acumulación del mercurio no tiene lugar de la misma forma en todos los tejidos de la parte aérea de la planta, si no que parece existir de forma significativa una mayor acumulación en las hojas, seguida de los tallos y los frutos. Huckabee *et al.* (1983) observó en estudios realizados en la zona de Almadén con robles (*Quercus pyrenaica*) que la mayor concentración de mercurio total se encontraba en las hojas y los tallos mientras que las menores en el fruto (bellotas). Del mismo modo estudios realizados por Sierra, M.J *et al.* 2008 en Almadén, demuestran que en la veza común (*Vicia sativa*), la mayor concentración de mercurio acumulada se alcanza en la raíz seguida de las hojas, tallos y frutos.

De este modo, parece que la adelfa, presenta una distribución diferencial del mercurio, acumulando las menores concentraciones en los frutos, siendo de algún modo protegidos.

Por otro lado, las semillas de la adelfa presentan un aspecto plumoso que ayuda a que su dispersión sea vía aérea (dispersión anemógama), desplazándose grandes distancias. Una posible futura línea de investigación podría centrarse en la evaluación de la capacidad de germinación que presentan semillas que contienen cierta concentración de mercurio y si ésta, es similar a la que presentan semillas libres de mercurio, intentando comprobar de que manera afecta en ellas, la concentración de mercurio que acumulan.

Por otro lado, es importante mencionar que *Nerium oleander* tiene una serie de características (biomasa, capacidad de absorción de mercurio, toxicidad, etc.) que la pueden convertir en una futura especie candidata a ser utilizada en tecnologías de fitoextracción de mercurio, ya que aunque la capacidad de absorción y acumulación de este metal no es muy grande, la biomasa que alcanza esta especie si lo es. Además se trata de una especie tóxica y no comestible, reduciendo de esta forma problemas de biomagnificación del mercurio en la cadena trófica, que de lo contrario podrían tener lugar.

7.4. Deposición superficial de mercurio en hojas.

De nuevo para determinar si existían diferencias significativas en la concentración de Hg_{total} en hojas lavadas por un lado y en hojas no lavadas por otro, entre el año 2007 y 2008 se llevó a cabo un estudio de comparación de medias, tomando como variables dependientes la [Hg] en hoja lavada (W) y no lavada (UNW) y como factor el año.

Puesto que el nivel crítico obtenido en el contraste de *Levene* sobre igualdad de varianzas fue menor a 0,05 (Tabla 6), se rechazó la hipótesis de igualdad de varianzas de las variables. Al no poder asumir igualdad de varianzas en hoja lavada y no lavada se recurrió al estadístico de Welch. Puesto que el nivel crítico (*Sig.*) asociado al estadístico de Welch en el caso de la [Hg] en hoja lavada y no lavada fue menor que 0.05 (Tabla 7), podemos concluir que existe evidencia estadística de que la concentración de Hg_{total} en hoja lavada por un lado y no lavada por otro, en 2007 y 2008 no son iguales.

Las diferencias de concentración de mercurio en hojas lavadas entre los distintos años pueden ser debidas a que aunque los ejemplares son los mismos en los dos años, la parte de la planta de donde se toma la muestra no lo es e incluso se pueden tomar partes más viejas o más nuevas, aumentando de ese modo la variabilidad de un año a otro. Respecto a las diferencias de concentración de mercurio en hojas no lavadas entre los distintos años pueden ser debidas a la acción de agentes externos (inundaciones, precipitaciones, etc.)

	Estadístico de <i>Levene</i>	gl1	gl2	Sig.
[Hg] hoja lavada	40,241	1	66	0,000
[Hg] hoja no lavada	14,728	1	57	0,000

Tabla 6. Pruebas de homogeneidad de varianzas de las variables [Hg] lavada y no lavada.

		Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
[Hg] hoja lavada	Welch	72,438	1	37,891	0,000
[Hg] hoja no lavada	Welch	62,984	1	35,909	0,000

Tabla 7. Pruebas robustas de igualdad de medias de la [Hg] en hoja lavada y no lavada en 2007 y 2008. a. Distribuidos en F asintóticamente.

Una vez determinado que existía evidencia estadística de que las concentraciones de mercurio en hojas lavadas por un lado y en hojas no lavadas en 2007 y 2008, se procedió a averiguar si existían diferencias significativas dentro de cada uno de los años en la concentración de mercurio en hojas lavadas y no lavadas.

Para ello se recurrió a un estudio de comparación de medias, tomando como variable dependiente la [Hg] en hoja y como factor el tratamiento (lavado o no lavado) en el año 2007 y posteriormente de la misma forma para el 2008.

Puesto que el nivel crítico asociado en el año 2007 al contraste *Levene* fue superior a 0,05 (*Sig.*= 0.650, con $\alpha=0,05$) no se rechazó la hipótesis de igualdad de varianzas. Al asumir igualdad de varianzas se llevó a cabo una prueba ANOVA de un factor, obteniendo que no existen diferencias significativas entre la concentración de mercurio en hojas lavadas y no lavadas dentro del año 2007 (Tabla 8).

	Suma de cuadrados	gl	Suma cuadrática	F	Sig.
Inter-grupos	0,050	1	0,050	1,441	0,235
Intra-grupos	2,118	61	0,035		
Total	2,168	62			

Tabla 8. ANOVA de 1 factor para las variables [Hg] en hoja y tipo de tratamiento (lavada y no lavada) en el año 2007.

Del mismo modo se procedió con el año 2008, Sin embargo en este caso debido a que el nivel crítico asociado al contraste de *Levene* fue inferior a 0,05 (*Sig.*= 0.04, con $\alpha=0,05$), no se pudo asumir igualdad de varianzas y se tuvo que recurrir a utilizar el estadístico de Welch. Puesto que el nivel crítico asociado a este estadístico fue inferior a 0,05 (Tabla 9), se concluyó que existían diferencias significativas entre la concentración de mercurio en hojas lavadas y no lavadas en 2008.

		Estadístico ^a	gl1	gl2	Sig.
[Hg] en hoja (2008)	Welch	9,571	1	51,913	0,003

Tabla 9. Pruebas robustas de igualdad de medias de la [Hg] en hoja lavada y no lavada en 2008. a. Distribuidos en F asintóticamente.

El hecho de haber encontrado diferencias significativas entre la concentración de las hojas lavadas en el año 2008, no resulta del todo representativo ya que numéricamente esta diferencia es muy pequeña. Aun así, esto puede ser debido a múltiples factores, entre los que se pueden encontrar un aumento de las precipitaciones medias anuales en este año, crecidas del río, que aumenten el aporte de depósitos sobre las hojas de la planta.

El gráfico 3 confirma los resultados anteriormente obtenidos. También muestra como la medianas tanto en el año 2007 como en el 2008 son sensiblemente superiores en el caso de las hojas no lavadas, mientras que la dispersión es mayor en el año 2007, tanto en la [Hg] en hoja lavada como no lavada. Todo ello nos lleva a concluir que la deposición superficial de mercurio sobre las hojas no es representativa, ya que es muy baja, por lo que puede ser debida a la deposición de pequeñas partículas de polvo en suspensión.

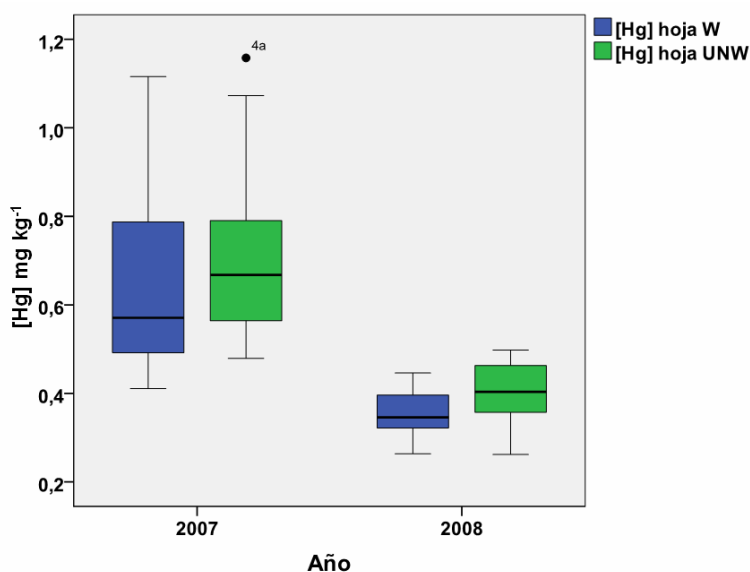


Gráfico 3. Diagrama de cajas de la concentración de Hg total (mg kg^{-1}) en hoja lavada (W) y no lavada (UNW) en el 2007 y 2008

7.5. Transferencia del mercurio suelo-planta

El factor de bioacumulación (BAF) expresa la relación entre la concentración del elemento en planta y la concentración de elemento en suelo. Puede calcularse referido tanto a la parte aérea como a la raíz, pues la capacidad de acumulación de las distintas partes de la planta es diferente. Es más usual utilizar la concentración en parte aérea o en sus diferentes partes (hojas, tallos, frutos, etc.), pues es la más fácilmente recolectable. Si se utiliza el valor de concentración total en suelo, el BAF es muy bajo, y representa la porción del elemento total en el suelo. Estos valores, si bien permiten una comparación a nivel general, pueden ser no realistas, debido a la mayor o menor capacidad de ese elemento total para pasar a disposición de la planta (Esteban, E. 2008). En este caso, para el cálculo del factor de bioacumulación ($[Hg]_{\text{organo}}/[Hg]_{\text{suelo}}$) se utilizó la fracción de suelo fácilmente disponible, ya que, como se ha comentado con anterioridad, resulta más útil que el contenido de Hg_{total} , para evaluar la transferencia suelo-planta y el riesgo ecotoxicológico del mercurio. Lucena *et al.* (1992) especifica que para el caso de gramíneas y leguminosas la acumulación depende del mercurio fácilmente disponible o asimilable y no del total, por lo que expone la ineficacia de la determinación de mercurio total como índice de potencial contaminante en lo que respecta a su absorción por las plantas.

El gráfico 4 confirma los resultados obtenidos anteriormente, mostrando que el BAF es mayor en el caso de las hojas, seguida de tallos y frutos, tanto en el año 2007 como en el año 2008. Además muestra como el BAF de la hoja es más disperso que el BAF del tallo y fruto en ambos años.

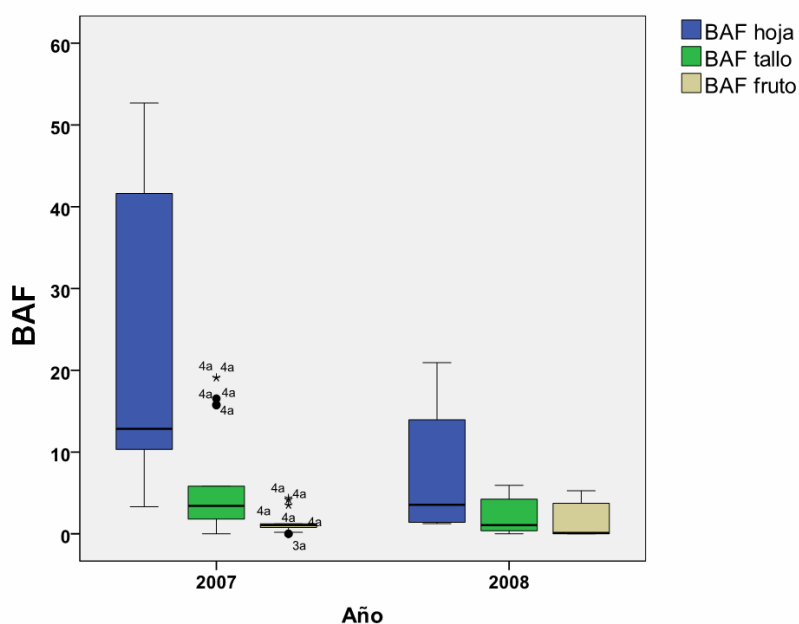


Gráfico 4. Diagrama de cajas del BAF en hoja, tallo y fruto en el 2007 y 2008

Otra relación importante a analizar es la existente entre la concentración de mercurio en parte aérea y raíz. Según Baker (1981), con este ratio se da una idea del tipo de estrategia que tiene la planta en respuesta al elemento tóxico, en este caso al mercurio. Es una forma de evaluar el grado de movilidad del mercurio en planta.

Debido a la dificultad que supone recolectar la raíz de la adelfa, en este caso sólo se dispone de una muestra tomada en el punto de muestreo 5, de mayo del 2008 (Tabla. 9). Por otro lado, al no contar con el valor de biomasa de la parte aérea de la planta, sólo se puede dar una aproximación de la concentración de mercurio total en la parte aérea considerando las concentraciones en las distintas fracciones. Así, a la vista de que todos los valores de concentración de mercurio en cada una de las fracciones de la parte aérea (hoja, tallo y fruto) del punto de muestreo 5 (Tabla 9), se encuentran por debajo de uno, y que el valor de concentración de mercurio en raíz para ese mismo punto se encuentra por encima de uno, la ratio que obtendríamos sería inferior a la unidad. Según Baker (1981), la adelfa sería clasificada como una planta excluyente, es decir, que no extrae el metal, ya que su relación parte aérea/raíz es inferior a uno, siendo su factor de bioacumulación muy bajo. Su acumulación es baja aunque la concentración de elemento en suelo sea muy elevada.

Parte de la planta	Parcela	Punto muestreo	Fecha	[Hg] (mg kg ⁻¹)
Hoja	R1	5	Nov-08	0,729 ± 0,060
Tallo	R1	5	Nov-08	0,085 ± 0,005
Fruto	R1	5	Nov-07	0,045 ± 0,004
Raíz	R1	5	May-08	1,204 ± 0,096

Tabla 10. Concentraciones medias de Hg (mg kg⁻¹) en hoja, tallo, fruto y raíz para el punto de muestreo 5.

Dentro de las fitotecnologías, tal vez esta planta fuese útil como fitoestabilizadora, aunque cómo se ha dicho en apartados anteriores sería interesante evaluarla como fitoextractora debido a su alta biomasa, su toxicidad y al hecho de que no es comestible. Para conseguir averiguar y reafirmar la hipótesis de que la adelfa podría considerarse una planta fitoestabilizadora, sería necesario realizar más estudios específicos.

8. CONCLUSIONES.

- La caracterización físico-química del suelo demuestra que nos encontramos ante un suelo no salino ($CE < 1,8 \text{ mScm}^{-1}$), con un pH ligeramente ácido o moderadamente ácido, con valores comprendidos entre 5,5 y 6,5. El porcentaje de materia orgánica es alto (5,4 – 8,2%), debido a que nos encontramos en una zona de ribera, favorecida por las condiciones de humedad, presencia de vegetación, condiciones del suelo, etc.
- Las concentraciones de Hg_{total} son elevadas (entre $116,7 \pm 24,3$ y $350,9 \pm 68,6 \text{ mg kg}^{-1}$ de Hg), incluso teniendo en cuenta el fondo geoquímico de la zona. Esto se debe presumiblemente a que esta zona ha recibido aportes extras de mercurio, debido al arrastre de sedimentos por parte del río, cuyo curso fluvial transita muy próximo a explotaciones mineras e incluso las atraviesa, como es el caso de la mina de El Entredicho. Además hay que recordar que próximo a la zona de estudio se encuentra la Estación de ferrocarril de Chillón, en la actualidad abandonada, pero que

en un pasado fue utilizada para el transporte y almacenaje previo de parte del mineral extraído en las minas del Distrito de Almadén.

- Aunque la concentración de Hg_{total} es alta, la fracción fácilmente disponible (soluble+intercambiable) es muy baja alcanzando valores que van desde $0,257 \pm 0,013$ hasta $0,017 \pm 0,000$ $mg\ kg^{-1}$ de Hg, suponiendo menos del 0,16 % de la concentración total de mercurio medido directamente sobre la muestra del suelo. El hecho de que la concentración de mercurio fácilmente disponible sea tan baja frente a la concentración de Hg_{total} , permite el desarrollo normal de la planta, sin mostrar síntomas de toxicidad frente al elemento. Además, el hecho de que la concentración de mercurio soluble sea también tan baja ($0,037 \pm 0,013$ a $0,004 \pm 0,000$ $mg\ kg^{-1}$ de Hg), asegura que los procesos de lixiviación y transporte de mercurio a las aguas superficiales y subterráneas sean muy reducidos, limitando de alguna modo los riesgos sanitarios y medioambientales que ello conllevaría.
- La distribución del mercurio absorbido por *Nerium oleander* no es homogénea en toda la parte aérea. En general la concentración es significativamente mayor en las hojas seguida de los tallos y los frutos.
- Aunque la concentración de mercurio en la planta no es muy elevada, la adelfa presenta una serie de características (alta biomasa, toxicidad, no comestible), que la pueden convertir en una futura candidata como fitoextractora de mercurio, en procesos de descontaminación de suelos.
- La deposición de mercurio en la superficie de las hojas, no es representativa y muestra valores muy bajos, por lo que presumiblemente será producida por la deposición de pequeñas partículas de polvo en suspensión.

9. BIBLIOGRAFIA.

- ADRIANO, D.C. (1986) Mercury. *Trace elements in the territorial environments*. 2nd Edition. Springer. New York, EEUU, p.p 411-458
- AKSOY, A. Y ÖZTÜRK, M.A (1997) *Nerium oleander* L. as a biomonitor of lead and other metal pollution in Mediterranean environments. *The Science of the Total Enviroments* 205: 145-150.
- ALTURO, R.A. (1998) Mapa de distribución geográfica de *Nerium oleander*. *Divulgación Forestal*. [En línea]. Tomado el 10/07/2010 en: <http://www.fut.es/~ralturo/arbore/apocyna/neoimap.jpg>
- ANDERSSON, A. (1979) Mercury in soil. In: Nriagu, J.O (Ed.) *The Biogeochemistry of mercury in the Environment*. Elsevier, Amsterdam, p.p 79-112.
- BAYER, A.J.M. (1981) Accumulators and excluders: Strategies in the reponse of plants to heavy metals. *Journal of Plant Nutrition* 3 (1-4): 643-654.
- BLOOM, N.S., PREUS, E., KATON, J. Y HILTHER, M. (2003) Selective extraction to asses the biochemically relevant fractionation of inorganic mercury in sediments and soils. *Analítica Chemical Acta* 479 (2): 233-248.
- BOENING, D.W. (2000) Ecological effects, transport and fate of Mercury: A general review. *Chemosphere* 40: 1335-1351
- CABRERO, J.I. (2005) Estudio de la dinámica de adsorción y tolerancia al mercurio de plantas de altramuz. *Proyecto fin de carrera C.C Ambientales (2004-2005)*. Tutor técnico: R. Millán. Dpto. Medio ambiente. Grupo de conservación y recuperación de suelos. CIEMAT.
- CALDERON, F., PAULOVA, M. (1999) Metodologías para la química de suelos. [En línea]. Tomado el 18/07/2010 en: http://www.drcalderonlabs.com/Metodos/Analisis_De_Suelos/MetodosQuimicosSuelos.htm#0
- CARRASCO, G. (2000) La Oretania Romana: Aportación a su conocimiento. Centro de estudios de Castilla La Mancha. [En línea] Tomado el 23/07/2010 en: <http://biblioteca2.uclm.es/biblioteca/ceclm/ARTREVISTAS/cem/CEM220CarrascoSerrano.pdf>
- CARRASCO, J., MANZANARES, P., TALLOS, A. Y RECREO, F. (2001). Bioremediation and economical renewal osf industrially degraded land using biomass fuel crops. *BIORENEW*. European Commission of Degraded land Using Biomass.
- CARRASCO, S. Y MILLÁN, R. (2008) Influencia de la adición de fertilizantes y enmendantes orgánicos en suelos contaminados por mercurio. *Informes técnicos del CIEMAT*. Nº 1153.
- CHOI, S.C. Y BARTHA, R. (1994) Environmental factor affecting Mercury methylation in estuarine sediments. *Bulletin Environmental Contaminated Toxicology* 53: 805-812.
- CONSTANTINO, E., GERATH, M., MIT CHELL, D., SEIGNEUR, C. Y LEVIN L. (1995) Mercury from power plants: a probabilistic approach to the evaluation of potential health risks. *Water, Air and Soil Pollution* 80: 1129-1138.
- CRAIG, P.J. (1986) Organometallic compounds in the environment principles and reaction. *Longman*, Essex p.p 65-101.

- DOADRIO VILLAREJO, A.L. (2004) Ecotoxicología y acción toxicológica del mercurio. Real Academia de Farmacia. [En línea] Tomado en : <http://www.raf.es/pdf/articulos/toxicologiadelmercurio.pdf>
- EPA (1997) mercury study report to Congress. Volume III. Fate and transport of mercury in the environment. *Office of air Quality planning and standards and office of research and development*. Washington. 376 p.p.
- EPA. US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (1997) EPA Mercury study report to congress, Volume III. Fate and transport of mercury in the environment [En línea]. Tomado el 10/04/2008 en: <http://www.epa.gov/ttn/oarpg/t3/reports/volume3.pdf>.
- ESCOTADURA Y MORROUGH, L. (1878) Historia del tratamiento metalúrgico del azogue en España. Tomado el 23/07/2010 en: <http://ruc.udc.es/dspace/bitstream/2183/2412/1/AD-10-50.pdf>
- ESTEBAN, E. (2008) Transferencia suelo-planta de los metales pesados. Dpto. de Química Agrícola. Universidad Autónoma de Madrid. En Contaminación de suelos, tecnologías para la recuperación. *Serie de ponencias*. (Eds. Rocío Millán y Carmen Lobo) CIEMAT.
- FERNÁNDEZ, R., SIERRA, M.J., VILLAGÓNIGA, M. Y MILLÁN R. (2010) Análisis de parámetros edáficos en Almadenejos. Comportamiento del mercurio en el sistema suelo-planta. *Informes técnicos del CIEMAT*. Nº 1193.
- FERRARA, R., MASERTI, B.E. Y BREDEY (1991) Mercury in abiotic and biotic compartment of and area affected by a geochemical anomaly (Mt. Amiata). *Water, Air and Soil Pollution* 56: 219-223.
- FLORA IBÉRICA. Adelfa (*Nerium oleander*). [En línea] Tomado el 15/07/2010 en: http://www.floraiberica.es/floraiberica/texto/borradores/vol_XI/11_131_01_Nerium.pdf
- GAONA MARTINEZ, X. (2004) El mercurio como contaminante global. Desarrollo de metodologías para la determinación en suelos contaminados y estrategias para la reducción de su liberación al medio ambiente. *Tesis de la Universidad Autónoma de Barcelona*. Dpto. Química. Unidad Química Analítica.
- GRAY, J.E., HINES, M.E, HIGUERAS, P.L, ADATTO, I. Y LASORSA, B.K (2004) Mercury speciation microbial transformations in mine wastes, stream sediments, and surface waters at the Almadén Mining District. Spain. *Environmental Science Technology*. 38: 4285-4292.
- GRIEB, T.M., DRISCOLL, C.T., GLOSS, S.P., SCHOFIELD, C.L. Y BOWIE, G.L. (1990) Factor affecting mercury accumulation in fish in the Upper Michigan Peninsula. *Environmental Toxicology & Chemistry* 9: 919-930.
- GUITIÁN OJEA, F. Y CARBALLAS FERNÁNDEZ, F. (1976) Análisis del complejo de suelo. *Técnicas de análisis del suelo*. Ed. Pico Sacro. Santiago de Compostela, p.p 151-152.
- HEERAMAN, D.A., CLAASSEN, V.P. Y ZASOSKI, R.J. (2001) Interaction of lime, organic matter and fertilizer on growth and uptake of arsenic and mercury by Zorro Fescue (*Vulpia myuros* L.). *Plant and soil* 234: 215-231
- HERNÁNDEZ, A.M. (1985) Estructura y génesis de los yacimientos de mercurio de la zona de Almadén y arrayanes. Salamanca, 64 p.p.

- HIGUERAS, P., ORYAZUM, R., BIESTER, H. LILLO, J. Y LORENZO, S. (2003) A first insight into mercury distribution and speciation in soils from the Almadén mining district. Spain. *Journal of Geochemical Exploration* 80: 95-104.
- HIGUERAS, P., OYARZUN, R. LORENZO, S., GRAY, J.E., BIESTER, H. (2007) Caso práctico: Mercurio en el medio ambiente del distrito minero de Almadén. Un fenómeno dinámico. [En línea]. Tomado el 16/07/2010 en : <http://www.aulados.net>
- HIGUERAS, P., OYARZUN, R., MUNHÁ, J., MORATA, D. (2000). The Almadén metallogenic cluster (Ciudad Real, Spain): alkaline magmatism leading to mineralization process at an intraplate tectonic setting. *Revista de la Sociedad Geológica de España*, 13-1: 105-119.
- HOGG, T.J., STEWARDJ.W.B. Y BETTANY, J.R. (1978) *Journal of Environmental Quality*. 7: 440-450.
- HUCKABEE, J.W., SANZ, F., JANZE, S.A. Y SALOMON, J. (1983). Distribution of Mercury in vegetation at Almadén, Spain. *Environmental Pollution* 30: 211-224.
- INÁCIO, M.N., PEREIRA, V. Y PINTO, M.S. (1998) Mercury contamination in sandy soils surrounding and industrial emission source (Estarreja, Portugal). *Geodermia* 85 (4): 325-339.
- KENDORFF, H. Y SCHNITZER, M. (1990) *Geochimica Cosmochimica Acta* 44: 1701-1708.
- LECHER, P.J., MILLER, J.R, HSU, L.C. Y DESILETS, M.O (1997) Mercury mobility at the Carson River Superfund Site, west-central Nevada, U.S.A: Interpretation of Mercury speciation data in mill tailings, soils, and sediments. *Journal of Geochemical Exploitation* 58 (2-3): 259-267.
- LINDERG S.E., JACKSON, D.R., HUKABEE J. W., JANKEN, S.A., LEVIN, M.J. Y LUNA, J.R. (1979) Atmospheric emission and plant uptake of mercury from agricultural soils near the Almadén mercury mine. *Journal Environmental Quality* 8: 572-578.
- LINDERG, S.E., MEYERS, T.P., TAYLOR, G.E., TURNER, R.R. Y SCHROEBER, W.H. (1991) *Journal of Geophysical Research* 97: 2519-2582.
- LINDSAY, W.L. (1979) Chemical equilibria in soils. *John Wiley and Sons*, New York, 449 p.p.
- LUCENA, J.J, HERNÁNDEZ, L.E, OLMOS, S. Y CARPENA, R. (1992) Valoración de métodos de extracción de mercurio en suelos contaminados. *Suelo y planta* 2: 747-755.
- LUCENA, J.J., HERNÁNDEZ, L.E. Y CARPENA-RUÍZ, R.O (1993) Micronutrient content in leguminous plants contaminated with Mercury. In: Fragoso, M.C.A., Van Beusichen, M.L. (Eds.). *Optimization of Plant Nutrition*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p.p 531-537.
- MAPA (1994) Ministerio de Agricultura, pesca y alimentación. Métodos oficiales de análisis Tomo 3: 622.
- MATILAINEN, T., VERTA, M., Y CORONEN, H., WSI-RAUVA, A. Y NIEMI, M. (2001) Behaviour of Mercury in soil profiles: Impact of increased precipitation, acidity and fertilization of mercury methylation. *Water, Air and Soil Pollution* 125: 105-119.
- MILLÁN, R., GAMARRA, R., SCHMID, T., SIERRA, M.J., QUEJIDO, A.J., SANCHÉZ, D.M., CARDONA, A.I. Y FERNÁNDEZ, M. (2005) Mercury content in flora and soils for Almadén mining area (Spain). *Science of the Total Environment* 368: 79-87.

- PEÑALOSA, J.M. (2008) Fitoextracción y fitoestabilización de metales pesados. Dpto. de Química Agrícola. Universidad Autónoma de Madrid. En Contaminación de suelos, tecnologías para la recuperación. *Serie de ponencias*. (Eds. Rocío Millán y Carmen Lobo) CIEMAT.
- PINHO, A.P., GUIMARAES, J.R.D., MARTINS, A.S., COSTA, P.A.S., OLAVO, G. VALENTIN, J. (2002) total mercury in muscle tissue of five shark species from brazilian offshore water: Effects of feeding habit, sex and length. *Environmental Research Section* 89: 250-258.
- PORTA, J., LÓPEZ-ACEVEDO, M. Y ROQUERO, C. (1999) Edafología para la agricultura y el medio ambiente. 2ª edición. Ediciones Mundi-prensa. Bilbao. España. 849 p.p.
- QUEAUVILLER, P.H., RVRET, G., LÓPEZ-SÁNCHEZ, J.F., RUBIO, R., URE, A. Y MAUNTAU, H. (1997). Certification of trace metal extractable contents in a sediments reference material (CRM 601) following a three-step sequential extraction procedure. *Science of the Total Environment* 205 (2-3): 223-234.
- RODRIGUEZ, L. (2006) Minería romana, minería castellana de la América colonial española: Historia de un tracto sucesivo. *AFDUDC* 10: 993-1010. [En línea]. Tomado el 23/07/2010 en : <http://ruc.udc.es/dspace/bitstream/2183/2412/1/AD-10-50.pdf>
- SANCHÉZ, D.M., QUEJIDO, A.J., FERNÁNDEZ, M., HERNÁNDEZ, C., SCHIMD, T., MILLÁN, R., GONZÁLEZ, M., ALDEA, M., MARTÍN, R. Y MORENTE, R. (2005) Mercury and trace element fractionation in Almadén soils by application of different sequential extraction procedures. *Analytical and bioanalytical Chemistry* 381: 1507-1513
- SAWIDIS, T., MARNASIDIS, A., ZACHARIADIS, G. Y STRATIS, J.A. (1995) A study of air pollution with heavy-metals in Thessaloniki city (Greece) using as biological indicators. *Arch Environmental Contaminated Toxicology* 28: 118-124
- SCHIMD, T. MILLÁN, R., VERA, R., TALLOS, A., RECREO, F., QUEJIDO, A., SÁNCHEZ, M^a, D. Y FERNÁNDEZ, M. (2003) The distribution of Mercury in a characterized soils affected by mining activities. *8th International FZK/TNO Conference on contaminated soil*. (Consoil 2003). Conference Proceedings. p.p. 3287-3294
- SCHIMD, T., MILLÁN, R., SÁNCHEZ, D., QUEJIDO, A., FERNÁNDEZ, M., SIERRA, M.J., PIROTTA, I. Y VERA, R. (2005). Mining influences on soils in the district of Almadén (Spain). *9th International FZK/TNO Conference on contaminated Soils* (Consoil 2005). Bordeaux (France).
- SCHUSTER, E. (1991) The behaviour of mercury in the soil with special emphasis on complexation and adsorption processes. A review of the literature. *Water, Air and Soil Pollution* 57: 667-680
- SEWARD M.R.D Y MASHHOUR, M.A. (1991) *Nerium oleander* as a monitor of heavy pollution. In: Öztürk, M.A., Erdem, Ü., Görk, G., editors. *Urban ecology*. Izmir (Turkey): Ege University Press: 48-61
- SIEGEL, S.M. Y SIEGEL, B.Z. (1998). *Water, Air and Soil Pollution* 40: 443-448
- SIERRA, M.J, MILLÁN, R., ESTEBAN, E., CARDONA, A.I. Y SHIMD, T. (2008) Evaluation of Mercury uptake and distribution in *Vicia sativa* L. applying two different study scales: Greenhouse conditions and lysimeter experiments. *Journal of Geochemical Exploration* 96: 203-209.

- SOIL SURVEY STAFF (1999) Soil taxonomy. A Basic System of Soil Classification for making and interpreting Soil Surveys. Second edition, United States Department of Agriculture, *Agricultural Handbook* Number 436.
- SOLTANPOUR, P.N Y SCHWAB, A.P, (1997) A new test for simultaneous extration of macro and micronutrients on alkaline soils. *Communication in Soil Science an Plants Analysis* 8: 195-207
- SPSS Statistics 17.0 (Versión 17.0.0.) (23-08-2008)
- STORELLI, M.M Y MARCOTRIGIANO, G.O (2002) Mercury speciation and relationship between mercury and selenium in liver of *Galeus melastomus* form Mediterranean Sea. *Marine Pollution Bulletin* 44: 1354-1358
- TESSIER, A., CAMBELL, P.G.C Y BISSON, M. (1979) Sequential extraction procedure fir the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry* 51: 844-851.
- ULISES, F. (2007) Efectos del mercurio en el medio ambiente y la salud. *Proyecto GAMA-COSUDE*. [En línea], Tomado el 16/07/2010 en: http://geco.minerartesanal.com/tiki_Download_Wiki_Attachment.php?attd=1248
- WARREN, H.V., DELAVault, R.E. Y BARASKO, J. (1966) *Economical Geology* 61: 1010-1028.
- WOLLAST, R., BILLEN, G. Y MACKENZIE, F.T. (1975) Behaviour of mercury in natural systems and its global cycles. *Ecological Toxicology Research: Effects of heavy metal and organohalogen compounds*. Proceeding of a NATO Science Conference. London, N.Y Plenum Press, p.p 145-166.
- XIAO, Z.F., MUNTHE, J., SCHROEDER, W.H. Y LINDQUIST, O. (1991) *Tellus* 43B: 267-279.
- XU, H. Y ALLARD, B. (1991) effects of fulvic acid on the speciation and mobilityily of mercury innocuous solutions. *Water, Air and Soil Pollution* 56: 717-719.

10. AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue realizado dentro del periodo formativo de prácticas del Master de Gestión y Tratamiento de residuos de la Universidad Autónoma de Madrid dirigido por D^a Isabel Herraéz Sánchez de las Matas. Quiero aprovechar la ocasión para agradecer a la Dirección y Coordinación del Master por hacer posible mi estancia en prácticas en un centro tan reconocido como es el CIEMAT.

De igual modo, me gustaría agradecer tanto a Rocío Millán como a María José Sierra, la oportunidad que me brindaron a la hora de aceptar mi petición de llevar cabo en la Unidad de conservación y recuperación de suelos del departamento de Medio Ambiente del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) este estudio. Además me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han prestado su ayuda y apoyo para conseguir que este trabajo saliera adelante: Javier Rodríguez Alonso, Sandra Carrasco Gil, Miguel Ángel Lominchar, Francisco Javier Díaz Puente, Thomas Schimd, Carmen Luchi, Celia Rico, etc.

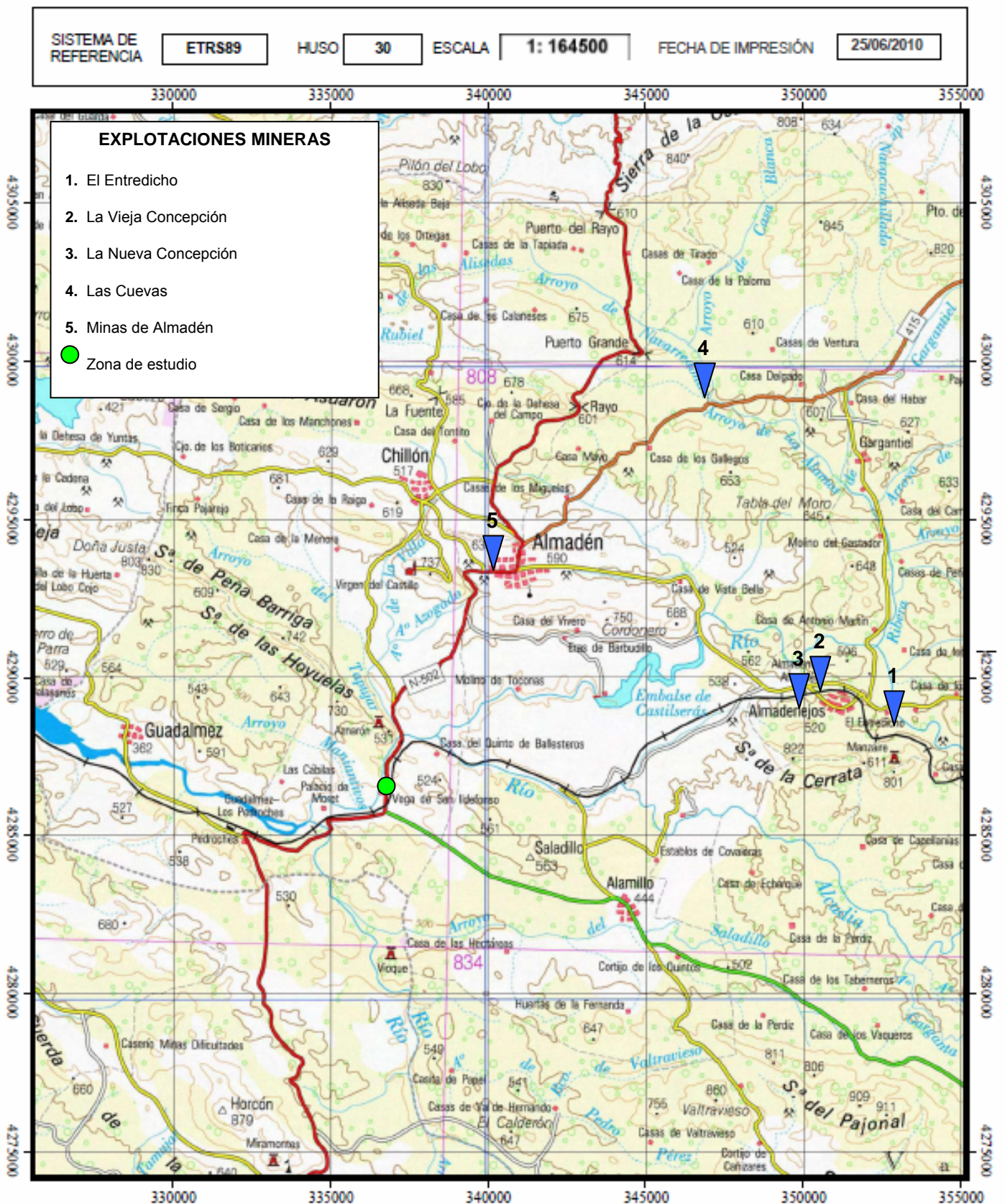
ANEXOS

ANEXO I: Propiedades físico-químicas del mercurio (Adriano, 1986)

PROPIEDADES FÍSICO- QUÍMICOS DEL MERCURIO			
Nº atómico	80	Formas en la naturaleza	Estado nativo
Peso atómico (g mol⁻¹)	200,59		Complejos inorgánicos
Punto de fusión (°C)	-38,9		Complejos orgánicos
Punto de ebullición (°C)	356,6		Sulfuros mercúricos y sulfosales mercúricas
Densidad (g/cm³)	13,55		
Solubilidad (g/l a 25°C)	6x10 ⁻⁵	Minerales principales	Cinabrio (principal mena)
Presión de vapor (mm a 20°C)	1,22x10 ⁻³		Livingsonita
Estados de oxidación	0, I y II		Metacinabrio

ANEXO II: Localización de las principales explotaciones mineras (Distrito de Almadén)

Salida gráfica del visor IBERPIX (Instituto Geográfico Nacional)



ANEXO III: Medición del pH en agua y en cloruro potásico por medio de pH-metros en una suspensión de mezcla suelo-líquido de (1:2,5)

- FUNDAMENTO. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Para llevar a cabo la medida del pH se puede utilizar un pH-metro. Éste consta de un electrodo de vidrio como electrodo indicador, cuyo potencial varía al introducirlo en la suspensión suelo-agua, hasta que se alcanza el equilibrio.

El pH de muestras edáficas puede medirse sobre pasta saturada en agua destilada, con lo que se obtiene el pH de la solución del suelo, que se corresponde a la acidez real. También puede medirse sobre pasta saturada en disolución 1 M de KCl, que mide la acidez potencial del suelo.

- MATERIALES

- Equipo: pH-metro modelo 250 (Fig. 11)
- Vaso de precipitado de 250 ml
- Papel de secar
- Frasco lavador de agua destilada
- Matraz erlenmeyer de 100 ml
- Agitador magnético. Imanes y recoge-imanos
- Disolución KCl 1 M, para ello disolver 74,5 g de KCl en 1 L de agua
- Solución tampón de pH=4,01, pH=7,00 y pH=10,01



Figura 11. pH-metro modelo 250

- PROCEDIMIENTO

Se enciende el pH-metro 30 minutos antes de la determinación, se calibra (con solución tampón de pH=4,01, pH=7,00 y pH=10,01) y se ajusta la temperatura en función de los grados que marque el termómetro del laboratorio.

Seguidamente se pesan 10 g de muestra de suelo, seca al aire y menor de 2 mm, para cada uno de los horizontes. Después se introduce en un erlenmeyer de plástico con capacidad de 100 ml. A continuación se le añaden 25 ml de agua destilada (o solución KCl 1 M) y se agita mecánicamente durante un mínimo de 30 minutos y un máximo de 2 horas, para lograr el equilibrio iónico.

Una vez que la muestra ha sido agitada se procede a la medida del pH, para ello debemos introducir el electrodo en sobrenadante. La lectura es considerada válida, si la variación de pH es menor a 0,1 unidad en 30 segundos.

Es importante que cada vez que llevemos a cabo una nueva medida lavemos con agua destilada de forma abundante y sequemos el electrodo indicador cuidadosamente.

ANEXO IV: Medición de la conductividad eléctrica en una suspensión de mezcla suelo-líquido (1:2,5) y (1:5)

- FUNDAMENTO. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Para llevar a cabo la medida de la conductividad eléctrica se puede utilizar un conductímetro.

- MATERIALES

- Equipo: Conductímetro (Crison EC-Meter Basic 30⁺) (Fig. 12).
- Vaso de precipitado de 250 ml.
- Papel de secar
- Frasco lavador de agua destilada
- Matraz erlenmeyer de 100 ml.
- Agitador magnético. Imanes y recoge-imanos
- Patrones de calibrado: solución tampón $147 \mu\text{S cm}^{-1}$ y $1413 \mu\text{S cm}^{-1}$, solución estándar $12,88 \text{ Ms cm}^{-1}$.



Figura 12. Conductímetro Crison EC-Meter Basic 30⁺

- PROCEDIMIENTO

Se enciende el conductímetro 30 minutos antes de la determinación y se calibra el equipo si fuera necesario (con los patrones de solución tampón $147 \mu\text{S cm}^{-1}$ y $1413 \mu\text{S cm}^{-1}$, solución estándar $12,88 \text{ mS cm}^{-1}$). Es conveniente sacar del frigorífico los patrones para que se atemperen antes de calibrar el equipo.

Seguidamente se pesan 10 g de muestra de suelo, seca al aire y menor de 2 mm, para cada uno de los horizontes. Seguidamente se introduce en un erlenmeyer de plástico con capacidad de 100 ml. A continuación, se le añaden 25 ml de agua destilada y se agita mecánicamente durante un mínimo de 30 minutos y un máximo de 2 horas, para lograr el equilibrio iónico.

Una vez que la muestra ha sido agitada se procede a la medida de la conductividad eléctrica, para ello debemos introducirla sonda en el sobrenadante y esperar a que se establezca la medida.

Es importante que cada vez que llevemos a cabo una nueva medida lavemos con agua destilada de forma abundante y sequemos la sonda de medida cuidadosamente.

Para llevar a cabo la medición de la conductividad eléctrica en una suspensión suelo-líquido (1:5) sólo debemos añadir 25 ml más de agua destilada a la suspensión anterior. El procedimiento a seguir una vez añadido el agua destilada es exactamente el mismo que en el caso anteriormente citado.

ANEXO V: Determinación de la materia orgánica del suelo por oxidación
(Método de *Walkey-Black*)

- FUNDAMENTO. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Con el método *Walkey-Black* se consigue determina el carbono orgánico del suelo que se oxida con dicromato potásico en medio ácido (H_2SO_4). El exceso de oxidante se valora con sulfato ferroso amónico (Sal de Möhr) y la cantidad de dicromato reducido.

- MATERIALES

- Erlenmeyer de 250ml
- Probeta de 100 ml
- Pipetas de 10 ml y de 1 ml
- Bureta de 25 o 50 ml
- Pesasustancias de 6 ml y de 3 ml
- Agitador magnético. Imanes y recoge-imanas
- Matraz aforado de 1L

- REACTIVOS

- Dicromato potásico 1 N. El dicromato potásico hay que prepararlo previamente, para ello se coge una cantidad de dicromato superior a 60 g y se mete en estufa durante toda la noche a 105 °C, pasado este tiempo se saca de la estufa y se mete en el desecador. De ahí se coge la cantidad que se necesite. Disolver 49,05 g de K_2CrO_7 , en agua destilada y enrasar a 1 L, usando el matraz aforado.
- Ácido sulfúrico concentrado (96%)
- Ácido orto-fosfórico (85%)
- Difenilamina en solución sulfúrica. Para ello disolver 2,5 g de difenilamina en 20 ml de agua destilada y añadir 100ml de ácido sulfúrico (96%)
- Disolución de sulfato ferroso amónico (sal de Möhr) 0,5 N. Disolver 196,10 g de $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \cdot 6H_2O$ en unos 800 ml de agua destilada que contengan 20 ml de H_2SO_4 concentrado (96%), medidos con bureta, enrasando a 1L utilizando un matraz aforado.
- Agua destilada

- PROCEDIMIENTO

Pesar 0,5 g de la muestra de suelo (con un tamaño inferior a 2 mm) secada al aire y colocarla en un erlenmeyer de 250 ml. Seguidamente añadir 10,0 ml de dicromato potásico 1N medidos en pipeta de 10 ml y agitar manualmente durante 30 segundos, con el fin de asegurar la mezcla. A continuación, se agregan 20,0 ml de H₂SO₄ concentrado (96%) y bajo la campana de extracción se agita de forma manual o mecánica durante se realiza la adicción. Después dejar la mezcla en reposo durante 30 minutos a ser posible una placa metálica o de amianto y a continuación añadir 100 ml de agua desionizada y dejar enfriar al aire.

Una vez fría la muestra, añadir 10,0 ml de ácido orto-fosfórico (85%) y 1,0 ml de indicador difenilamina. La adición del ácido ortofosfórico y de la difenilamina debe realizarse de forma seguida y justo antes de la valoración.

Por último, se procede a la valoración de la mezcla con sal de Möhr mediante bureta y utilizando un agitador magnético hasta cambio de color. La coloración vira de azul violáceo hasta verde brillante. En este punto anotar los ml de sal de Möhr gastados en la valoración.

- CÁLCULOS

Los datos obtenidos deben ser llevados a la siguiente fórmula, con el fin de averiguar el % de materia orgánica que presenta la muestra de suelo analizada:

$$\%M.O = (1 - M/B) * 6,7/P$$

Donde:

M= ml de sal de Möhr gastados en la valoración de la muestra

B= ml de sal de Möhr gastados en la valoración del blanco

P= peso de la muestra

ANEXO VI: Medida de la concentración total de mercurio de suelo u planta (Analizador Avanzado de Mercurio - AMA 254)

FUNDAMENTO. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Para poder determinar la concentración total de mercurio en cada uno de los sistemas analizados se dispone, en este caso de un equipo específico (AMA 254). Este equipo se trata de un espectrómetro de absorción atómica diseñado para el análisis de muestras sólidas y líquidas sin necesidad de tratamientos previos. Para ello utiliza la técnica de generación de vapor de mercurio (Fig. 13)



Figura 13. Analizador Avanzado de Mercurio AMA 254

COMPONENTES BÁSICOS DEL AMA 254

La figura 14 muestra el esquema funcional básico del Analizador Avanzado de mercurio AMA 254. Como podemos ver el dosificador (1), y la navecilla (21), sirven para introducir la muestra en el interior del analizador. La entrada al tubo de descomposición (2), se emplea para la descomposición térmica de la muestra, mediante el horno de descomposición (4). En la parte de la salida del tubo de descomposición se encuentra el tubo catalizador (3), el cual se mantiene a una temperatura constante de unos 750 °C.

El amalgamador de oro (5), se emplea para retener el mercurio que proviene del flujo de productos descompuestos en la zona de combustión anteriormente citada. El mercurio puede ser liberado mediante el otro horno (6).

El bloque de cubetas de medida (7), mantiene una temperatura constante gracias a la cámara de calentamiento de cubetas (13), que contiene dos cubetas en serie (14 y 16) (para bajos y altos contenidos). Un volumen de retardo es colocado entre las dos cubetas fuera del eje óptico de ellas. Este volumen de retardo es mayor que el volumen de la cubeta que porta el mayor volumen de medida (14). Como fuente de luz se utiliza una lámpara de mercurio a baja presión (8), la cual puede ser completamente cerrada gracias al obturador (9).

Delante del detector (10) se encuentra colocado un filtro de interferencias (11), el cual es capaz de aislar la línea espectral de 253,65 nm. La bomba de enfriamiento (12) permite un rápido enfriamiento del amalgamador después de liberar el mercurio.

El punto 18, se compone de la lámpara de mercurio y fuente de alimentación del detector junto con las fuentes del microcomputador 8051 y las fuentes de alimentación necesarias para los hornos y otras partes del equipo. Además sirve como separación galvánica de la electrónica del micro de los circuitos de potencia.

El módulo 19 del microcomputador 8051 contiene también los circuitos digitales, un convertidor A7D de 12 bits y amplificadores de medida del detector. La salida (23) asegura la comunicación entre el microcomputador con el PC.

Además hay un flujo constante de oxígeno a través del conjunto de partes analíticas del equipo, desde la entrada 22 al regulador 20, manteniendo un flujo constante de salida (17).

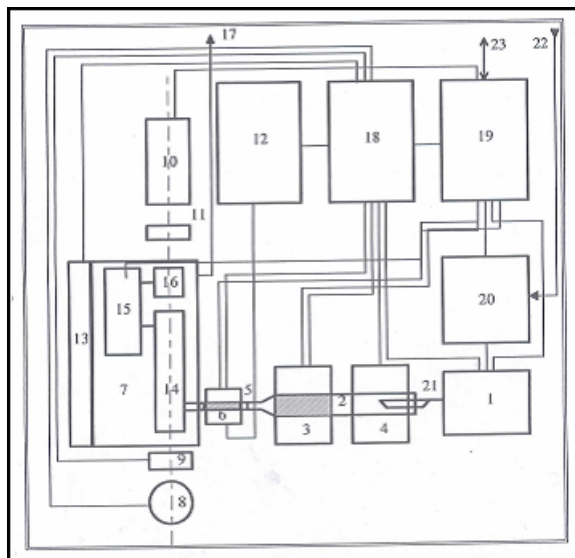


Figura 14. Esquema funcional del AMA 254

- DESCRIPCIÓN DEL TRATAMIENTO DE MUESTRAS EN EL AMA 254

Una muestra de volumen o peso conocido es colocada en una navecilla e introducida en el tubo de descomposición. Previamente al proceso de descomposición la muestra es secada. Los productos de la descomposición de la muestra son arrastrados por el oxígeno a la segunda parte del tubo de descomposición, donde se encuentra el catalizador. En este punto concluye la oxidación, y los halógenos y óxidos de nitrógeno/azufre son retenidos.

A continuación los productos de la descomposición son transportados hasta el amalgamador donde quedarán atrapados de forma selectiva el mercurio. Tanto el amalgamador, como el bloque de cubetas, están temporizados a 120 °C para evitar la condensación acuosa.

Una vez terminada la descomposición de la muestra, se estabiliza el amalgamador y el contenido de mercurio es medido, ya que éste es liberado mediante un rápido calentamiento. El mercurio liberado es arrastrado con la corriente de oxígeno hacia la cubeta larga de medida. A continuación, prácticamente todo el mercurio es retenido en el volumen de retardo y posteriormente introducido en la cubeta corta de medida.

Después del calentamiento del amalgamador, actúa una bomba de enfriamiento para enfriarlo y quede preparado para la siguiente medida, sin necesidad de ningún retardo.

Todos los datos medidos son transferidos a través del módulo microcomputador 8051 al PC.

ANEXO VII: ETAPA 1 Y ETAPA 2 de la Extracción secuencial de suelo bulk.

- FUNDAMENTO. PRINCIPIO DEL MÉTODO

Existen gran variedad de procedimientos de extracción secuencial, con los que se consigue determinar la distribución del mercurio en las distintas fracciones de un suelo, como por ejemplo los BCR-SES (Quevauviller *et al.*, 1997) y de Tessier *et al.*, 1979) o incluso algunos específicos, diseñados para el mercurio (Lechler *et al.*, 1997, Inácio *et al.*, 1998, Bloom *et al.*, 2003). Sin embargo, en este caso se ha optado por elegir un método diseñado en el CIEMAT y específico para el mercurio en suelos de Almadén (Sanchez *et al.*, 2005). El método completo transcurre en 7 etapas, las cuales representan a una fracción del suelo diferente (Tabla 11).

Fracciones	Agente extractante
Soluble en agua	H ₂ O mili-Q
Intercambiable	NH ₄ Cl 1M (pH=7)
Carbonatos	Solución Morgan (NH ₄ AC 1M pH= 4,5)
Hidróxidos de Fe y Mn amorfos	Solución Tamn (ácido oxálico/oxalato amónico pH=2,8)
Oxihidróxidos de Fe cristalinos y determinados minerales de arcillas	HCl 6M
Oxidable	H ₂ O ₂ (pH= 2, HNO ₃) y CH ₃ COONH ₄ (pH=2, HNO ₃)
Residuo final	Agua regia/HF

Tabla 11. Etapas de extracción secuencial en siete pasos para suelos de Almadén (Sánchez *et al.*, 2005)

• ETAPA 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 mili-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).

- Guardar en nevera

- **ETAPA 2**

Se toma el residuo de la Etapa 1 y se añade 20 ml de NH_4Cl 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 H_2O de mili-Q
- 10 minutos de centrifugación a 10.000 rpm
- Filtrar lavado 0,45 μm y reunir con filtrado anterior
- Acidular con HNO_3 suprapur (0,5 ml)
- Aforar a 25 ml con H_2O mili-Q y guardar en nevera

ANEXO VIII. Tratamiento estadístico de los datos

Se llevó a cabo un estudio minucioso, tanto de los datos, como de las variables con las que se contaba, y tras él se determinó que las pruebas estadísticas que más se aproximaban a nuestros objetivos, y por lo tanto a las que serían sometidas nuestros datos eran:

- Diagrama de cajas y bigotes: este tipo de gráficos ofrecen información descriptiva sobre el comportamiento de cierta variable dependiente entre dos grupos comparados. Permite obtener una idea rápida sobre tres aspectos esenciales de la distribución: el centro, la dispersión y la forma. Incluye la mediana, los percentiles 25 y 75, y una serie de puntos que identifican a los valores que se alejan excesivamente del centro.
- Prueba T para dos muestras independientes (contrastar sobre medias): Permite contrastar hipótesis referidas a la diferencia entre dos medias independientes.
- Análisis de varianza (ANOVA de un factor): Este análisis sirve para comparar grupos en una variable cuantitativa. Se trata, por lo tanto, de una generalización de la *prueba T* para dos muestras independientes en el caso de diseños con más de dos muestras. Se tendrá una variable independiente o categórica cuyos niveles se quieren comparar entre si y una variable dependiente cuantitativa. El ANOVA de un factor permite obtener información de esa comparación. La hipótesis que se pone a prueba en el ANOVA de un factor es que las medias

poblacionales (las medias de la variable dependiente en cada nivel de la variable independiente) son iguales. Si las medias poblacionales son iguales, eso significa que los grupos no difieren en la variable dependiente. La estrategia para poner a prueba la hipótesis de igualdad de medias consiste en obtener un estadístico, llamado F , que refleja el grado de parecido existente entre las medias que se están comparando.

- Prueba de homogeneidad de varianzas: Permite evaluar este supuesto mediante el contraste de *Levene*, la cual contrasta la hipótesis nula de que las varianzas poblacionales son iguales.
- Estadístico de Welch: Este estadístico representa una alternativa robusta al estadístico F del ANOVA, cuando no se puede asumir que las varianzas poblacionales.
- Comparaciones *post hoc* o comparaciones *a posteriori*: El estadístico F de ANOVA únicamente permite contrastar la hipótesis general de que los J promedios comparados son iguales. Para saber qué media difiere de que otra se debe utilizar un tipo de contrastes denominados comparaciones múltiples *post hoc* o comparaciones *a posteriori*. En el caso de que no se puedan asumir igualdad de varianzas poblacionales se podrá utilizar entre otros el método de Games- Howell.

