

## Directrices para la caracterización del material dragado y su reubicación en aguas del dominio público marítimo-terrestre



Puertos del Estado



**CEDEX**  
CENTRO DE ESTUDIOS Y  
EXPERIMENTACIÓN  
DE OBRAS PÚBLICAS



COMISIÓN INTERMINISTERIAL DE ESTRATEGIAS MARINAS

2015

## **DIRECTRICES PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL DRAGADO Y SU REUBICACIÓN EN AGUAS DEL DOMINIO PÚBLICO MARÍTIMO-TERRESTRE**

---

### ***Coordinación General del trabajo:***

- División para la Protección del Mar. D.G. de Sostenibilidad de la Costa y del Mar. MAGRAMA
- Puertos del Estado.

### ***Equipo de redacción:***

- División para la Protección del Mar. D.G. de Sostenibilidad de la Costa y del Mar. MAGRAMA.
- Puertos del Estado.
- SG de Residuos. D.G. de Calidad y Evaluación Ambiental y Medio Natural. MAGRAMA .
- Centro de Estudios de Puertos y Costas. CEDEX. Mº de Fomento.
- Instituto Español de Oceanografía. Mº de Economía y Competitividad.

### ***Otras unidades integrantes del grupo de trabajo de la Comisión Interministerial de Estrategias Marinas:***

- D.G. Coordinación Competencias CCAA. MINHAP.
- D.G. de Naciones Unidas y Derechos Humanos. MAEC.
- D.G. de la Marina Mercante. Mº de Fomento.
- D.G. de Protección Civil y Emergencias. Mº del Interior
- D.G. de Recursos Pesqueros y Acuicultura. MAGRAMA.
- Estado Mayor de la Armada. Mº de Defensa.
- Instituto de Diagnostico Ambiental y Estudios del Agua. CSIC. Mº de Economía y Competitividad.
- SG de Evaluación Ambiental. D.G. de Calidad y Evaluación Ambiental y Medio Natural. MAGRAMA.
- SG de Protección de la Costa. D.G. de Sostenibilidad de la Costa y del Mar. MAGRAMA.

# DIRECTRICES PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL DRAGADO Y SU REUBICACIÓN EN AGUAS DEL DOMINIO PÚBLICO MARÍTIMO-TERRESTRE

---

## INDICE

Introducción .....	1
Capítulo I: Normas generales .....	6
Capítulo II: El dragado y la zona a dragar .....	10
Capítulo III: Toma de muestras de los materiales a dragar .....	15
Capítulo IV: Caracterización de los materiales .....	21
Capítulo V: Clasificación del material dragado .....	29
Capítulo VI: Medidas preventivas y evaluación de las opciones de gestión .....	37
Capítulo VII: Reubicación del material dragado en el mar .....	43
Capítulo VIII: Permisos y autorizaciones .....	50
Capítulo IX: Vigilancia ambiental .....	55

## ANEJOS:

I. Diagrama para la clasificación y gestión del material a dragar.

II. Toma de muestras de los materiales a dragar.

III. Caracterización bionómica.

IV. Metodología analítica.

V. Medidas preventivas y uso de las mejores prácticas ambientales.

VI. Guía para la realización del estudio de usos productivos.

Bibliografía.



## **INTRODUCCIÓN**

Las operaciones de dragado resultan esenciales para posibilitar el acceso a los puertos de los buques que, cada vez, presentan mayores requerimientos de calado debido al aumento de sus dimensiones y para el desarrollo de las infraestructuras portuarias.

Gran parte del material extraído durante estas actividades requiere su vertido en el mar. La mayoría del material dragado, al estar compuesto fundamentalmente por material geológico inerte, presenta niveles de contaminación escasamente significativos (es decir, cercanos a los niveles de fondo naturales), por lo que sus impactos sobre el medio marino en caso de vertido se limitan a los efectos de naturaleza física que pudieran llegar a producir. Sin embargo, en determinados proyectos o dentro de un proyecto de dragado en ciertas zonas, algunos materiales están contaminados en unos niveles tales que se deben aplicar limitaciones ambientales en el desarrollo de sus opciones de gestión.

En general, al considerar las opciones de gestión adecuadas, la opción preferente debe ser retener el material dragado dentro del mismo sistema sedimentario acuático de donde es originario, siempre que sea técnica, social, económica y medioambientalmente factible hacerlo. Existen múltiples ejemplos, tanto en el contexto nacional como internacional, sobre usos beneficiosos del material dragado (por ejemplo, para regeneración de playas o rellenos portuarios) que deben resultar la opción preferente de gestión, siempre que sus características físicas y ambientales lo hagan posible antes que optarse por su vertido en el mar.

De acuerdo con el “Inventario de dragados en los puertos españoles, actualización 2013”, desde que se cuenta con registros históricos de las operaciones de dragado en España (año 1975), el volumen de material dragado en los puertos de nuestro país resulta ser de casi 334 millones de metros cúbicos con una media cercana a unos 8,7 millones anuales. De estos volúmenes, el 51% ha sido reutilizado y un 11% ha sido almacenado en depósito por lo que el volumen de material vertido al mar durante este periodo ha resultado ser de algo más de 125,5 millones de metros cúbicos. Se trata, pues, de operaciones de una magnitud tal que, en caso de no ejecutarse siguiendo unos criterios ambientales adecuados, pueden llegar a comprometer el estado ambiental del medio marino.

Tanto el Convenio sobre la prevención de la contaminación del mar por vertimiento de desechos y otras materias (Convenio de Londres) como el Convenio sobre la protección del medio ambiente marino del Atlántico Nordeste (Convenio OSPAR) y el Convenio para la protección del medio marino y la región costera del Mediterráneo (Convenio de Barcelona), de los que España es parte contratante, han aprobado Directrices para la gestión del material dragado que sirven de orientación para que los Estados desarrollen su propia normativa de ámbito nacional. En los casos de los Convenios de Londres y OSPAR se han

adoptado recientemente unas nuevas versiones revisadas de tales Directrices (años 2013 y 2014 respectivamente).

En un intento de desarrollo estatal de lo especificado en estos Convenios, en el año 1994 el Centro de Estudios y Experimentación de Obras Públicas (CEDEX) publicó las *“Recomendaciones para la gestión del material dragado en los puertos españoles”* (RGMD), que fueron acordadas por los diferentes órganos de la Administración General del Estado competentes en los procedimientos de aprobación y autorización de las obras de dragado y su vertido en el mar (Puertos del Estado, Dirección General de la Marina Mercante, extinta Secretaría General de Pesca Marítima, extinta Dirección General de Costas, extinta Dirección General de Política Ambiental e Instituto Español de Oceanografía). Por diferentes razones, las mencionadas RGMD no llegaron a tener carácter normativo pero, sin embargo, han venido siendo aplicadas en la práctica totalidad de los proyectos de dragado.

Las RGMD establecían el procedimiento general que debía seguirse en la caracterización del material dragado, incluyendo la definición provisional de los umbrales de contaminación para evaluar la aceptabilidad ambiental del vertido al mar de los mismos (niveles de acción), los estudios necesarios para la selección de la zona de vertido y los programas de vigilancia ambiental que debían desarrollarse. Sin embargo, los avances acontecidos desde su publicación tanto en el ámbito de los Convenios Internacionales para la protección del medio marino como en la legislación comunitaria y en el conocimiento científico, junto con los problemas puntuales detectados durante estos años en la aplicación de las RGMD, hacen imprescindible su actualización.

Con independencia de las Recomendaciones anteriormente mencionadas, la normativa nacional vigente regula las obras de dragado a nivel muy general por cuanto el artículo 64 del Real Decreto Legislativo 2/2011, de 5 de septiembre, por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Puertos del Estado y de la Marina Mercante únicamente establece el régimen de autorizaciones aplicable y en su apartado 3 indica que los proyectos de dragado incluirán un estudio de la gestión de los productos de dragado, y en particular la localización de la zona o zonas de vertido y su tratamiento, así como, de manera genérica, los estudios necesarios desde el punto de vista ambiental pero sin precisar el contenido y amplitud de los mismos. De igual modo, el artículo 56 de la Ley 22/1988 de Costas establece que los vertidos al mar desde buques y aeronaves se regularán por su legislación específica y en el artículo 63 se indica que, para otorgar las autorizaciones de extracciones de áridos y dragados, será necesaria la evaluación de sus efectos sobre el dominio público marítimo-terrestre, referida tanto al lugar de extracción o dragado como al de descarga en su caso.

En el ámbito comunitario, los productos de dragado han sido incluidos en la Lista Europea de Residuos (aprobada por la Decisión de la Comisión 2000/532/CE, de 3 de mayo y modificada por las Decisiones de la Comisión, 2001/118/CE, de 16 de enero, y

2001/119/CE, de 22 de enero, y por la Decisión del Consejo 2001/573/CE, de 23 de julio). La Lista Europea de Residuos fue incluida como anejo 2 de la ORDEN MAM/304/2002, de 8 de febrero, por la que se publican las operaciones de valorización y eliminación de residuos y la lista europea de residuos.

Con posterioridad, la Directiva 2008/98/CE (Directiva marco de residuos), transpuesta al ordenamiento jurídico español por la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados, establece que serán de aplicación a todo tipo de residuos si bien tanto en el artículo 2.3 de la Directiva como en el artículo 2.3 de la Ley 22/2011 se establece que: “sin perjuicio de las obligaciones impuestas en virtud de la normativa específica aplicable, se excluirán de su ámbito de aplicación los sedimentos reubicados en el interior de las aguas superficiales a efectos de gestión de las aguas y de las vías navegables, de prevención de las inundaciones o de mitigación de los efectos de las inundaciones y de las sequías, o de creación de nuevas superficies de terreno, si se demuestra que dichos sedimentos son no peligrosos”. Cabe entender, pues, al igual que lo hace el Convenio OSPAR en sus Directrices revisadas en 2014, que la gestión de los materiales de dragado en las aguas superficiales quedaría exenta de la aplicación de la normativa de residuos únicamente en el caso de demostrarse que se trata de sedimentos no peligrosos. Sin embargo, hasta el momento, ni en el ámbito comunitario, ni en el de los Convenios Internacionales para la protección del medio marino ni en el nacional, se ha establecido método alguno para evaluar esta circunstancia, aspecto que resulta indispensable resolver.

La Directiva Marco del Agua (Directiva 2000/60/CE) – DMA- persigue el establecimiento de un marco comunitario para la protección de las aguas continentales, subterráneas, de transición y costeras que prevenga todo deterioro adicional y proteja y mejore el estado de los ecosistemas acuáticos, promueva un uso sostenible del agua, aumente la protección y mejora del medio acuático a través de medidas orientadas a la reducción y/o supresión de vertidos, emisiones y pérdidas de determinadas sustancias, y contribuya a paliar los efectos de las inundaciones y sequías.

Dentro de la estrategia de la Directiva 2000/60/CE para la lucha contra la contaminación de las aguas se ha adoptado la Directiva 2008/105/EC relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, la cual establece la lista de sustancias prioritarias (Anexo X de la Directiva 2000/60/CE) así como las normas de calidad ambiental establecidas para cada una de estas sustancias en las distintas categorías de aguas superficiales, donde se incluyen las aguas de transición y costeras. Esta Directiva fue transpuesta a la normativa española a través del RD 60/2011, de 21 de enero, que incluye, además de las normas de calidad ambiental de las sustancias prioritarias, otras sustancias, denominadas “preferentes” por su importancia específica en el contexto español (contaminantes específicos de cuenca) junto con sus correspondiente normas de calidad.

Tanto la lista de sustancias prioritarias como algunas de las normas de calidad, han sido recientemente modificadas por la Directiva 2013/39/UE. Aunque ambas Directivas proponen normas de calidad ambiental para las sustancias prioritarias de cara a una progresiva reducción de las emisiones, descargas y pérdidas de dichas sustancias, tales criterios se establecen exclusivamente en las matrices de agua y/o biota, mientras que la definición de criterios de calidad específicos para el caso de los sedimentos se deja a la decisión de los Estados Miembros. En aplicación de los objetivos establecidos por la DMA resulta fundamental evitar el deterioro del estado de las masas de aguas costeras y de transición como consecuencia de las operaciones de dragado y vertido de material dragado.

Por último, la Directiva 2008/56/CE, de 17 de junio de 2008, por la que se establece un marco de acción comunitaria para la política del medio marino (Directiva marco sobre la estrategia marina), transpuesta al ordenamiento jurídico español por la Ley 41/2010, de 29 de diciembre, de protección del medio marino, tiene como principal objetivo el lograr o mantener un buen estado ambiental del medio marino a más tardar en el año 2020, para cuya consecución se crean las estrategias marinas como herramienta de planificación del medio marino. La evaluación del estado ambiental del medio marino se debe realizar a través de los 11 Descriptores incluidos en su anejo I, que han sido desarrollados con posterioridad a través de los 56 Indicadores aprobados por la Decisión de la Comisión 2010/477/UE sobre los criterios y las normas aplicables al buen estado ambiental de las aguas marinas. Del conjunto de estos 11 Descriptores, tres de ellos están íntimamente relacionados con las operaciones de dragado y gestión de los productos de dragado en el mar (D6: integridad de los fondos marinos, D7: alteración permanente de las condiciones hidrográficas y D8: concentraciones de contaminantes) si bien, sobre todo cuando se procede al vertido al mar de los materiales de dragado, varios de los restantes pueden resultar afectados en mayor o menor medida (D1: Biodiversidad, D2: Introducción de especies alóctonas, D5: Eutrofización y D10: Basuras marinas). Además, la directiva relaciona la actividad de dragado entre las presiones e impactos que deben ser considerados en la evaluación inicial de las estrategias marinas, así como en sus sucesivas actualizaciones, por ejemplo en cuanto a “pérdidas físicas”, “daños físicos” y “contaminación por sustancias peligrosas” (Anexo III, cuadro 2).

De acuerdo con las disposiciones anteriormente citadas, se hace imprescindible actualizar el procedimiento estandarizado para la caracterización del material dragado y evaluación de sus posibles opciones de gestión, teniendo en cuenta, además, el necesario establecimiento de la metodología adecuada para determinar si se trata o no de sedimentos no peligrosos.

Fruto de lo anteriormente expuesto, las presentes Directrices establecen los contenidos mínimos que, desde el punto de vista ambiental, debe incluir todo proyecto de dragado, el procedimiento para la adquisición de las muestras, las determinaciones y ensayos necesarias para su caracterización, con indicación de la metodología aplicable, la



clasificación del material dragado en categorías, incluyendo la definición de los criterios para considerarlo como sedimento no peligroso, proporciona el procedimiento para evaluar las diferentes opciones de gestión, y establece las condiciones a cumplir para el vertido al mar de los materiales y el desarrollo de los programas de vigilancia ambiental. Se incluye, asimismo, un Capítulo dedicado al análisis de los permisos y autorizaciones necesarios para la gestión de los materiales en el DPMT.

Debe señalarse que si bien el ámbito de aplicación se corresponde con la totalidad del DPMT, esto es tanto el interior de las zonas portuarias como actuaciones que pudieran realizarse fuera de las mismas, quedan excluidos del mismo la extracción de materiales con el fin exclusivo de regeneración de playas u obtención de materiales para rellenos portuarios que se desarrollen fuera del dominio público portuario, por cuanto tanto la tipología de estas actuaciones como las características de los materiales extraídos resultan claramente diferentes a los dragados que se realizan con fines de navegación. No obstante, en tanto en cuanto no se desarrollen directrices específicas para tales actuaciones, las presentes Directrices podrían aplicarse con carácter orientativo.

La presente versión de Directrices incorpora algunas modificaciones sobre el texto original de las *Directrices para la caracterización del material dragado y su reubicación en el dominio público marítimo terrestre* que fueron aprobadas por la Comisión Interministerial de Estrategias Marinas en su reunión ordinaria celebrada el 24 de abril de 2014 y viene a actualizar las mismas y sustituir las *Recomendaciones para la gestión del material dragado en los puertos españoles* que fueron siendo utilizadas hasta el año 2014.

## CAPÍTULO I: NORMAS GENERALES

### Artículo 1. **Objeto**

Las presentes Directrices tienen por objeto el establecimiento de las condiciones aplicables para regular las operaciones de dragado y la reubicación de los materiales dragados en las aguas del dominio público marítimo-terrestre (DPMT).

### Artículo 2. **Ámbito de aplicación**

1. Las condiciones establecidas en las presentes Directrices serán de aplicación en las operaciones de dragado y de reubicación de sedimentos que se lleven a cabo en las aguas del dominio público marítimo-terrestre, incluyendo el dominio público portuario (DPP), de acuerdo a como vienen definidos por la Ley 22/1988, de 28 de julio, de Costas y el Real Decreto Legislativo 2/2011, de 5 de septiembre, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Puertos del Estado y de la Marina Mercante.

2. Las presentes Directrices no serán de aplicación a las actuaciones de explotación de yacimientos submarinos de áridos fuera de la zona I de los puertos para la obtención de materiales para su aporte a playas o para rellenos portuarios, que se regularán por sus directrices específicas.

### Artículo 3.- **Definiciones**

A efectos de las presentes Directrices se entenderá por:

1. *Antrópico*: Originado por la actividad de los seres humanos
2. *Bioensayo*: Ensayo de laboratorio en el que organismos vivos son expuestos al material dragado o sus lixiviados para determinar sus efectos o toxicidad.
3. *Colocación*: depósito intencionado de material dragado en las aguas del DPMT para un uso productivo o sobre el que se aplican técnicas de confinamiento.

4. *Concentración individual*: resultado de la determinación analítica para un determinado contaminante realizada sobre una muestra individual o sobre una muestra compuesta.
5. *Concentración media*: resultado del cálculo, realizado según el procedimiento establecido en el artículo 24, en el que se tienen en cuenta los resultados analíticos obtenidos para un conjunto de muestras individuales o compuestas y ponderando en función de la masa de materiales representada por cada una de ellas.
6. *Confinamiento*: Depósito diseñado para contener material dragado y minimizar la dispersión de contaminantes en el medio acuático.
7. *Composición de muestras*: mezcla de materiales obtenidos en diferentes estaciones de muestreo o, dentro de una misma estación, a diferentes niveles de profundidad.
8. *Dragado*: extracción de materiales del fondo del DPMT.
9. *Dragado de limpieza*: aquel cuyo único objeto es la retirada deliberada de material contaminado del fondo marino con el propósito de protección de la salud humana o el medio ambiente.
10. *Dragado de mantenimiento*: aquel realizado para asegurar que los canales de navegación o zonas de atraque o fondeo portuario mantienen sus dimensiones (superficie y profundidad) de diseño.
11. *Dragado de primer establecimiento*: aquel realizado con fines de navegación, al objeto de aumentar o profundizar los canales de navegación y las áreas portuarias, así como creación de nuevos puertos y los realizados dentro de otros proyectos de ingeniería como excavación de zanjas para cimentación de estructuras portuarias o colocación de cables o tuberías.
12. *Dragado para rellenos portuarios*: aquel realizado con el objetivo de utilizar el material para relleno de estructuras portuarias.
13. *Estación de muestreo*: Punto concreto del DPMT en el que se lleva a cabo la toma de muestras de aguas o sedimento superficial y/o profundo.
14. *Gestión del material dragado*: Término general que incluye los diferentes destinos, transporte y operaciones a realizar con el material dragado. Incluye el establecimiento de medidas preventivas y mitigación de efectos negativos y la vigilancia ambiental.
15. *Límite de detección*: en una determinación analítica, valor de concentración o señal de salida por encima del cual se puede afirmar, con un nivel declarado de confianza, que una muestra es diferente de un blanco, entendiéndose por blanco una muestra que no contiene el analito de interés.

16. *Límite de cuantificación*: en una determinación analítica, múltiplo constante del límite de detección que se puede determinar con un grado aceptable de exactitud y precisión. El límite de cuantificación se puede calcular utilizando un patrón o muestra adecuada y se puede obtener del punto de calibración más bajo en la curva de calibración, excluido el valor del blanco.
17. *Material dragado*: cualquier material geológico y/o de naturaleza bioclástica extraído de fondos del DPMT.
18. *Material arenoso* o arenas: parte del material dragado de tamaño comprendido entre 0,063 mm y 2,0 mm.
19. *Material fino* o finos: parte del material dragado, constituido por limos y arcillas, de tamaño inferior a 0,063 mm.
20. *Material grueso* o gruesos: parte del material dragado de tamaño superior a 2 mm.
21. *Mejores prácticas ambientales*: La aplicación más adecuada de la combinación de medidas de control y estrategias tendentes a reducir el impacto ambiental.
22. *Muestra individual*: cada una de las muestras de sedimento, superficiales o profundas, obtenidas durante la campaña de muestreo realizada de acuerdo a lo indicado en el Capítulo III y en el Anejo II.
23. *Muestra tipo M*: toda muestra individual procedente de una zona Tipo M (muelles) definida según lo indicado en el artículo 11.1.
24. *Muestra tipo G*: toda muestra individual procedente de una zona Tipo G (dársenas) definida según lo indicado en el artículo 11.1.
25. *Muestra tipo C*: toda muestra individual procedente de una zona Tipo C (canales o vías navegables) definida según lo indicado en el artículo 11.1.
26. *Muestra compuesta*: muestra formada por la mezcla de dos o más muestras individuales de acuerdo con lo establecido en el artículo 14.
27. *Niveles de acción*: umbrales de concentración de ciertos parámetros químicos que servirán para clasificar el material a dragar en las categorías definidas en el artículo 24.
28. *Recinto de almacenamiento*: construcción ubicada en las aguas superficiales específicamente diseñada para el almacenamiento de material dragado.
29. *Reubicación*: término general que incluye la colocación y el vertido de material dragado en las aguas del DPMT.
30. *Tóxico*: que produce efectos letales o subletales cuando es ingerido o entra en contacto con los seres vivos.

31. *Uso productivo*: operación de colocación del material dragado en el DPMT cuyo resultado principal es que el material sirva a una finalidad útil cumpliendo una función particular (por ejemplo soporte de actividades o una mejora ambiental).
32. *Vertido al mar*: toda evacuación deliberada en las aguas del DPMT de material dragado con el único fin de deshacerse del mismo sin utilizar técnica de confinamiento.
33. *Zonas de exclusión*: parte del DPMT en la que por sus valores naturales o usos legítimos no estará permitido el vertido de material dragado aunque sí su colocación de acuerdo con el artículo 31.
34. *Zonas de vertido restringidas*: parte del DPMT cercana a la costa, de escasa profundidad o en las inmediaciones de zonas con algún tipo de protección ambiental según se indica en el artículo 31.
35. *Zonas sensibles*: aquellas zonas del DPMT que por sus características naturales o sus usos antrópicos requieran una consideración especial a la hora de planificar el dragado o la reubicación del material dragado. Incluirán las zonas que contengan hábitats o especies prioritarios, vulnerables, biogénicos o pertenecientes a las categorías incluidas en las Directivas europeas o Convenios Internacionales que resulten de aplicación. En particular, praderas de fanerógamas marinas, comunidades de maërl o formaciones de coralígeno así como las zonas de baño, zonas de cultivos marinos, arrecifes artificiales, instalaciones de producción de energía, zonas de captación de agua, zonas de interés arqueológico, yacimientos de áridos y las ocupadas por cualquier infraestructura submarina.

## CAPÍTULO II: EL DRAGADO Y LA ZONA A DRAGAR

### Artículo 4. *El proyecto de dragado*

1. Toda actuación de dragado tendrá la consideración de obra marítima y requerirá del correspondiente proyecto, a elaborar de acuerdo con lo establecido en la Ley 22/1988, de 28 de julio, de Costas y el Real Decreto 876/2014, de 10 de octubre, por el que se aprueba el Reglamento General de Costas , así como con el artículo 64 del Real Decreto Legislativo 2/2011, de 5 de septiembre, por el que se aprueba el Texto Refundido de la Ley de Puertos del Estado y de la Marina Mercante. El proyecto incorporará una justificación de la necesidad de ejecutar el dragado, una caracterización de la zona y un estudio de la gestión del material dragado que se realizarán de acuerdo con las presentes Directrices.

2. En aquellos proyectos que deban ser sometidos a evaluación de impacto ambiental en virtud de la legislación estatal o autonómica que resulte de aplicación, la consideración de las condiciones establecidas en las presentes Directrices formará parte del estudio de impacto ambiental o del documento ambiental en lo que se refiere a los aspectos contenidos en las mismas.

3. En los proyectos que puedan afectar directa o indirectamente a lugares de la Red Natura 2000, la consideración de las condiciones establecidas en las presentes Directrices formará parte de la adecuada evaluación de sus repercusiones sobre dicho lugar.

### Artículo 5. *Justificación de la necesidad del dragado*

1. El promotor de la actuación de dragado deberá justificar de manera adecuada la necesidad de la misma así como su propósito, estableciendo:

- i. Objetivos del dragado que se pretende realizar (primer establecimiento, mantenimiento, limpieza o relleno portuario)
- ii. Razones técnicas que hacen necesaria la realización del dragado.
- iii. El volumen de materiales a dragar, expresado en metros cúbicos.
- iv. La superficie afectada por el dragado, expresada en metros cuadrados.

- v. El espesor de materiales a dragar en cada zona de la superficie afectada, aportando un plano batimétrico previo reciente y un plano batimétrico de la situación que se pretende alcanzar.
- vi. Método de dragado previsto (hidráulico o mecánico) y eventuales medidas preventivas que se plantean.

2. La información anterior se incorporará sobre plano a una escala adecuada a la superficie del proyecto pero, en todo caso, no inferior a 1:10.000. Se incluirá adicionalmente, como referencia, la carta náutica de la zona cuando esté disponible a la escala adecuada.

3. En el caso de que se trate de una actuación a realizar sobre una zona ya dragada con anterioridad, se suministrará información, siempre que pueda disponerse de ella, sobre las actuaciones de dragado realizadas previamente y los efectos producidos, valorados a través de los resultados de los seguimientos ambientales que se hubieran realizado.

4. Se minimizará, en la medida en que resulte técnicamente posible y económicamente viable el volumen de material a dragar, el volumen de material a verter al mar y, en general, las superficies afectadas por el dragado y el vertido.

#### Artículo 6. ***Caracterización de la zona a dragar***

1. El promotor de la actuación de dragado deberá recopilar, con carácter previo a la caracterización de los materiales y sobre la base de los datos existentes, la siguiente información referente a la zona de actuación y su entorno:

- i. Descripción del tipo y fuentes de contaminación significativa que soporta la zona a dragar (emisarios o conducciones de vertido de aguas residuales, industriales o mixtas; carga/descarga de graneles con especial consideración de los hidrocarburos, indicando tipo e instalación especial, o no; usos históricos de la zona; aportes de ríos; escorrentías; etc.).
- ii. Estimación de los objetos o materiales de origen antrópico que pudiera contener el material a dragar. La información recogida deberá ser suficiente para evaluar la compatibilidad de la actuación respecto a la Estrategia Marina correspondiente respecto al Descriptor 10 (Basuras Marinas).

- iii. Existencia de algún programa de control sobre las fuentes de contaminación, o si se ha hecho alguna intervención ambiental relevante en relación con los vertidos a las aguas de la zona a dragar o su entorno inmediato, siempre que pueda disponerse de ella.
- iv. Composición granulométrica esperada.
- v. Características batimétricas de la zona.
- vi. Descripción de características biológicas, con especial atención a los hábitats y especies, especialmente bentónicas, y a la posible presencia de especies invasoras que pudieran ser propagadas con la actuación de dragado. La información recogida deberá ser suficiente para evaluar la compatibilidad de la actuación respecto a la Estrategia Marina correspondiente respecto a los Descriptores 1 (Biodiversidad) y 2 (Especies alóctonas).
- vii. Resultados de los programas existentes de seguimiento de calidad de las aguas.
- viii. Localización de áreas marinas o marítimo-terrestres amparadas por cualquier figura de protección autonómica, nacional o internacional en el entorno de la zona de actuación, con determinación expresa de la distancia mínima hasta las mismas.
- ix. Identificación de otros usos legítimos del mar que concurren sobre la zona a dragar o el entorno que pudiera resultar afectado por la actuación, con especial atención a la existencia de zonas sensibles y zonas de explotación de recursos pesqueros y marisqueros.

2. En actuaciones con un volumen de sedimento a dragar superior a 100.000 m<sup>3</sup> y con zonas de baño, de cultivos marinos, tomas de agua (para refrigeración, desalación o cultivos marinos) o con cualquier figura de protección ambiental marina o marítimo-costera situada a una distancia igual o inferior a 2 millas náuticas de la zona de dragado, será preceptiva la realización de un estudio de transporte y dispersión que permita conocer su posible afección por la actuación de dragado, con indicación de las comunidades biológicas susceptibles de ser alteradas por la misma.

#### Artículo 7. **Procedimiento de gestión del material dragado**

1. Con excepción de los materiales declarados como exentos de caracterización conforme al artículo 8, todo material a dragar estará sujeto a una caracterización preliminar y, en su caso, química y biológica que permitirá definir los procesos posteriores de su gestión.



2. Los resultados de la caracterización de los materiales, realizada conforme a los Capítulos III y IV, indicarán si, en principio, el material a dragar es susceptible de vertido al mar.

3. En función de los resultados de la caracterización de los materiales, se evaluará su consideración como sedimento no peligroso y, en tal caso, serán clasificados en una o más categorías de las que se establecen en el Capítulo V.

4. Se establecerán las medidas preventivas y las opciones de gestión del material conforme a lo establecido en el Capítulo VI.

5. Con carácter general se evaluarán los posibles usos productivos, de acuerdo con el artículo 26, para la totalidad o la parte del material que reúna las características adecuadas, optándose por los mismos siempre que se llegue a un acuerdo entre el promotor del dragado y el órgano competente en la materia relativa al uso productivo por el que se ha optado. En la evaluación de los usos productivos se considerarán aspectos tales como la salud humana, la seguridad y la afección al medio ambiente.

6. En caso de vertido al mar se seguirán las especificaciones del Capítulo VII de las presentes Directrices.

7. El Anejo I de las presentes Directrices incluye el diagrama a seguir en el proceso de toma de decisiones para la gestión del material a dragar y autorización de reubicación en las aguas del DPMT.

#### Artículo 8. **Material exento de caracterización**

1. Sin perjuicio de las obligaciones impuestas en virtud de la regulación específica aplicable, en ausencia de fuentes apreciables de contaminación quedarán exentos de caracterización aquellos proyectos cuyo volumen total sea igual o inferior a 10.000 m<sup>3</sup> de los que se tenga información local acerca de la calidad del sedimento que permita asegurar razonablemente que el material no esté contaminado.

2. Quedarán asimismo exentos de caracterización aquellos materiales a dragar, o dentro de un proyecto de dragado aquellas zonas, cuyos materiales estuviesen constituidos exclusivamente por material geológico consolidado o no consolidado de tamaño superior a 2 mm.

## CAPÍTULO III: TOMA DE MUESTRAS DE LOS MATERIALES A DRAGAR

### Artículo 9. *Campaña de toma de muestras*

1. Con carácter previo a cualquier actuación de dragado no exenta de caracterización, se llevará a cabo una campaña de muestreo de acuerdo con lo especificado en el presente Capítulo y los procedimientos del Anejo II.

2. Para dragados o zonas concretas dentro de cada actuación que supongan un espesor medio de dragado inferior a 1 metro, será suficiente la adquisición de muestras de la superficie del fondo. Cuando el espesor de dragado sea superior, resultará preceptiva la adquisición de muestras profundas hasta alcanzar, como mínimo, el espesor de sedimento que se proyecte extraer, siempre que ello sea posible sin utilizar técnicas de obtención de la muestra que perturben significativamente la disposición sedimentaria de los testigos. En estos casos, cada columna de sedimento obtenida se segmentará en muestras individuales de 50 cm de longitud que serán analizadas por separado o compuestas previamente a su análisis de acuerdo con los criterios establecidos en el artículo 14.

3. En casos de dragados de mantenimiento que se realicen sobre materiales depositados en los cuatro años anteriores, resultará suficiente la adquisición de muestras superficiales con independencia del espesor de la capa de material a dragar siempre y cuando no se plantee un aumento de calado sobre la situación preexistente y no hubiera habido variación significativa de las características ambientales.

### Artículo 10. *Posicionamiento*

Cada estación de muestreo deberá ser posicionada con una exactitud sub-métrica, preferentemente mediante el empleo de sistemas de posicionamiento GPS diferencial y, su posición referida mediante sus coordenadas geográficas de latitud y longitud en el sistema ETRS89 (European Terrestrial Reference System 1989) en el ámbito de la Península Ibérica y las Islas Baleares. En el caso de las Islas Canarias, se utilizará el sistema REGCAN95.

Artículo 11. **Número de estaciones de muestreo**

1. Al objeto de tener en consideración el gradiente de contaminación horizontal que suele existir en los puertos, el esfuerzo de muestreo dependerá del tipo de zona portuaria incluida en el proyecto de dragado, de acuerdo con la siguiente tipología:

- i. Zona tipo M: la que bordea los muelles. En estas zonas se ubicará al menos una estación de muestreo cada 100 metros lineales. Cada estación será representativa de un área de 50 m de ancho desde el borde del muelle y una superficie máxima de 5.000 m<sup>2</sup>.
- ii. Zona tipo G: el resto de zonas a dragar en dársenas portuarias. En estas zonas, el número mínimo de estaciones de muestreo se calculará en función de la superficie de las mismas mediante la expresión:

$$N = \frac{S}{25\sqrt{S}}$$

donde:

N = Número mínimo de estaciones de muestreo.

S = Superficie del área objeto del dragado, excluida la superficie de las zonas tipos M y C, expresada en m<sup>2</sup>.

$25\sqrt{S}$  = Superficie representada por cada estación de muestreo suponiendo una distribución equidistante de las mismas.

Si de la aplicación de la expresión anterior no resulta un número entero de muestras, se redondeará por exceso.

- iii. Zona tipo C: los canales o vías navegables en los que se proyecta un dragado de un mínimo de 10 Km de longitud. El número mínimo de estaciones de muestreo podrá ser, para esta zona, 1/3 inferior al resultante

de la expresión empleada para la zona tipo G, sin alterarse el número mínimo de estaciones necesarias en el resto de zonas que pudiera requerirse en las mismas. En caso de proyectos de dragado a realizar en canales de gran longitud, se definirán tantas zonas tipo C como tramos de dragado continuos de 10 Km de longitud pudieran existir, realizándose el cálculo de estaciones de muestreo necesarias de manera independiente para cada tramo.

- iv. Otras zonas: En caso de que el proyecto de dragado incluyera una zona que no se corresponda con alguna de las anteriores tipologías, el cálculo del número de estaciones de muestreo se realizaría en función de la superficie de la misma mediante la expresión indicada para las zonas tipo G.

2. Cuando un proyecto de dragado incluya más de un tipo de las cuatro zonas establecidas en el apartado anterior, el cálculo del número de estaciones de muestreo se realizará de manera independiente para cada una de ellas.

3. En aquellos proyectos en que resulte preceptiva la adquisición de muestras profundas, estas deberán ser adquiridas, dentro del área en la que el espesor de dragado sea superior a 1 metro, como mínimo en una tercera parte del número de estaciones resultante de los criterios establecidos en los apartados anteriores. Tales estaciones de muestreo se distribuirán de manera uniforme a lo largo del área en la que fuera necesaria su adquisición. Fuera de esta área, se tomarán muestras superficiales en el resto de estaciones.

4. En cualquier caso, el número mínimo de estaciones de muestreo dentro del área proyectada para la realización del dragado deberá ser de 3 y, en proyectos en los que resulte preceptiva la adquisición de muestras profundas se procederá, como mínimo, a su toma en una de las estaciones de muestreo.

5. El promotor de la actuación podrá optar por la toma y análisis de un número de muestras superior al mínimo y tener en cuenta sus resultados analíticos de cara a la clasificación del material, siempre y cuando se respeten los criterios de distribución de las estaciones de muestreo a los que se refiere el artículo 12.

## Artículo 12. **Distribución de las estaciones de muestreo**

1. La distribución de las estaciones de muestreo deberá tender a que se cubra la variabilidad prevista de toda la zona objeto de dragado respecto a la contaminación, debiendo ser su número superior en las proximidades de fuentes puntuales de contaminación (aliviaderos de aguas pluviales, vertidos urbanos e industriales, etc.). En el caso de que no se conozcan o que no se espere gradiente importante de contaminación, las estaciones se intentarán distribuir de manera uniforme.

2. En las zonas tipo C, las estaciones de muestreo se distribuirán de manera equidistante a lo largo del canal y, preferentemente, situadas sobre su eje central.

## Artículo 13. **Conservación, transporte y almacenamiento de las muestras**

1. Para la conservación, transporte, almacenamiento y manipulación de las muestras se seguirá lo indicado al respecto en el Anejo II de las presentes Directrices.

2. Las diferentes determinaciones analíticas deberán ser realizadas en un plazo razonable de tiempo, preferiblemente dentro de las horas siguientes a la adquisición de muestras para análisis microbiológicos y de tres semanas para determinaciones químicas o, en su caso, bioensayos. Es recomendable iniciar los bioensayos dentro de la semana siguiente.

## Artículo 14. **Composición de muestras para la caracterización de los materiales**

1. Para la realización de las determinaciones analíticas correspondientes a la caracterización preliminar y caracterización química, se podrá optar por la composición ponderada de muestras, siempre y cuando se cumplan todas las condiciones siguientes:

- Que los sedimentos presenten similares características físicas y organolépticas.
- Que las estaciones de muestreo correspondan al mismo tipo de zona (M, G, C u otras zonas) y estén situadas en localizaciones adyacentes o, dentro de una misma estación de muestreo, en estratos contiguos.

- Que las estaciones de muestreo estén sometidas a similares condiciones hidrodinámicas, y
- Que no sea esperable un gradiente significativo de contaminación (en la horizontal o en la vertical).

2. El informe de caracterización de los materiales deberá describir con detalle las muestras que se han compuesto y justificar adecuadamente los criterios tenidos en consideración para dicha composición.

3. Con carácter general, cada muestra compuesta estará formada, como máximo, hasta por cuatro muestras individuales, excepto para las zonas tipo M o C en las que cada muestra compuesta se formará únicamente con dos muestras individuales.

4. En los casos en que se opte por la composición de muestras, el número total de muestras a analizar (muestras individuales más muestras compuestas) no podrá ser, en ningún caso y para cada uno de los tipos de zona, inferior al 50% del número mínimo de estaciones de muestreo establecido de acuerdo con el artículo 11.

5. Las muestras compuestas se formarán mezclando partes alícuotas de cada muestra individual proporcionales al volumen de material a dragar representado por cada una de ellas. Si  $m_T$  es la masa total seca de la muestra compuesta, la masa  $m_i$  de la parte alícuota de la muestra  $i$  se calculará mediante la siguiente fórmula:

$$m_i = m_T \cdot \frac{V_i}{V_T}$$

Siendo:

- $V_i$ , el volumen de material a dragar representado por la muestra individual  $i$ .
- $V_T$ , el volumen de material a dragar representado por la muestra compuesta, igual a la suma de los volúmenes representados por las muestras individuales:  $V_T = V_1 + \dots + V_n$  siendo  $n$  el nº de muestras que se componen.

6. A todos los efectos, cada muestra compuesta se considerará representativa de un volumen de sedimentos igual a la suma de los volúmenes representados por cada una de las muestras individuales que han compuesto y éste deberá ser gestionado conjuntamente.

7. La composición de muestras se realizará en laboratorio, en condiciones que aseguren que no se produce contaminación exógena.

8. En los casos en que se realice composición de muestras, deberá conservarse una porción suficiente de las muestras individuales por si fueran necesarias posteriores determinaciones sobre las mismas.



## CAPÍTULO IV: CARACTERIZACIÓN DE LOS MATERIALES

### Artículo 15. *Caracterización preliminar*

1. Las determinaciones analíticas y ensayos para la caracterización preliminar de los materiales se realizará sobre la totalidad de muestras compuestas y las muestras individuales que no se hayan compuesto.

2. La caracterización preliminar de los materiales incluirá la determinación de sus características granulométricas, la concentración de sólidos, el contenido en carbono orgánico total (COT) y la realización del test previo de toxicidad (TPT)<sup>1</sup>. Estas determinaciones se realizarán, de acuerdo con la metodología indicada al respecto en el Anejo IV de las presentes Directrices, sobre la muestra total para el caso del análisis granulométrico y sobre la fracción inferior a 2 mm para el resto de determinaciones.

3. Cuando y la zona de dragado o la prevista para la reubicación del material esté próxima a zonas de baño, de cultivos marinos, de extracción de recursos marisqueros o de captación de agua para consumo humano o para acuicultura, deberá procederse a la determinación de los parámetros indicadores de contaminación fecal incluidos en la normativa estatal o autonómica que resulte de aplicación, debiéndose adoptar en su caso las técnicas de gestión o medidas preventivas necesarias para asegurar su cumplimiento.

4. Las determinaciones a las que hace referencia el apartado anterior podrían no realizarse si a través de los correspondientes estudios de transporte y dispersión, pudiese demostrarse la no afección a las mencionadas zonas.

### Artículo 16. *Material exento de caracterización química y biológica*

El material dragado o una parte del mismo podrá ser declarado exento de caracterización química y biológica y clasificado directamente como de categoría A cuando los resultados de la caracterización preliminar indican que cada una de las muestras que lo representan cumple las siguientes tres condiciones:

---

<sup>1</sup> Ensayo de ecotoxicidad en fase sólida con *Vibrio fishery* según el protocolo detallado en el Anejo IV, ensayándose un intervalo de diluciones finales comprendido entre 63 y 8.000 mg/ℓ.

- contenido de finos inferior al 10%;
- concentración de COT inferior al 2%, y
- el resultado del TPT indica una concentración CE50 superior a 2.000 mg/ℓ.

#### Artículo 17. **Caracterización química**

1. En todas las muestras sobre las que sea necesario realizar la caracterización química se determinarán, de acuerdo con la metodología analítica incluida en el Anejo IV, los siguientes contaminantes:

- Arsénico (As)
- Cadmio (Cd)
- Cobre (Cu)
- Cromo (Cr)
- Mercurio (Hg)
- Níquel (Ni)
- Plomo (Pb)
- Zinc (Zn)
- Policlorobifenilos (PCBs), determinando de manera individual los congéneres IUPAC 28, 52, 101, 118, 138, 153 y 180.
- Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), determinando de manera individual la concentración de los siguientes compuestos: Antraceno, Benzo(a)antraceno, Benzo(ghi)perileno, Benzo(a)pireno, Criseno, Fluoranteno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Pireno y Fenantreno.
- Tributilestaño (TBT) y sus productos de degradación (Dibutilestaño –DBT- y Monobutilestaño –MBT-).
- Hidrocarburos (C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub>).

2. No obstante a lo anterior, la determinación de PCBs, HAPs, TBTs e hidrocarburos no resultará preceptiva cuando:

- Exista información suficiente de investigaciones o estudios de vigilancia previos, en los 5 años anteriores, que indiquen la ausencia de contaminación significativa por este tipo de compuestos, o
- En ausencia de fuentes conocidas de contaminación (puntuales o difusas) las muestras presentan un porcentaje de finos inferior al 10% y un contenido en COT inferior al 1,5%.

3. Basándose en la información local de las fuentes de contaminación (puntuales o difusas) o aportes históricos conocidos, podrá resultar necesario el análisis de otros compuestos, como por ejemplo:

- Otros Policlorobifenilos.
- Pesticidas organoclorados, con especial atención a DDT y sus productos de degradación, pentaclorobenceno, hexaclorobenceno y hexaclorociclohexanos.
- Pesticidas organofosforados.
- Otros compuestos orgánicos del Estaño.
- Otros agentes anti-fouling.
- Dibenzodioxinas y dibenzofuranos policlorados (PCDDs y PCDFs).

Cuando se proceda a la determinación de alguno de los anteriores compuestos, la evaluación de los resultados se realizará en función del mejor conocimiento científico existente, los criterios incluidos en la evaluación inicial de las estrategias marinas o los niveles de acción utilizados por otros países de nuestro entorno.

4. Las determinaciones químicas se realizarán sobre la fracción de la muestra inferior a 2 mm, previamente separada mediante tamizado del resto de materiales de mayor tamaño que pudieran estar contenidos en la misma, de acuerdo con los procedimientos indicados en el Anejo IV.

5. Los resultados de la caracterización química se expresarán como concentración en mg/kg sobre materia seca.

#### Artículo 18. **Especificaciones técnicas de los análisis químicos**

1. Los laboratorios encargados de la realización de los análisis garantizarán la calidad de sus medidas mediante los pertinentes programas de aseguramiento y control de la calidad de las mismas de acuerdo con los requerimientos recogidos en el Anejo IV, que deberán ser específicamente documentados en el informe de resultados analíticos, junto con la descripción detallada de los protocolos analíticos empleados en el análisis de las muestras.

2. Los análisis químicos se realizarán, preferentemente, siguiendo la metodología analítica incluida en el Anejo IV.

3. El límite de cuantificación para las determinaciones de metales y metaloides deberá ser al menos 5 veces inferior a la concentración establecida para cada contaminante como nivel de acción A según se define en el artículo 22, excepto para el caso del mercurio que deberá ser, al menos, 3 veces inferior a dicho nivel.

4. Para el caso de los PCBs, compuestos para los que los niveles de acción se establecen como suma de 7 congénere individuales, el límite de cuantificación en la determinación de cada congénere deberá ser igual o inferior a 0,002 mg/kg sobre materia seca.

5. Para los HPAs, en los que los niveles de acción se establecen como la suma de 9 compuestos diferentes, el límite de cuantificación deberá ser igual o inferior a 0,04 mg/kg sobre materia seca para cada uno de los compuestos.

6. Para el caso del TBT y sus productos de degradación, el sumatorio de los límites de cuantificación individuales de los distintos compuestos (TBT, DBT y MBT) deberá ser inferior a la concentración establecida como nivel de acción A, expresada como concentración de Sn sobre materia seca.

7. Para Hidrocarburos (C10-C40) el límite de cuantificación deberá ser igual o inferior a 100 mg/kg sobre materia seca.

8. Los informes de laboratorio deberán detallar para cada contaminante el límite de cuantificación y cómo se ha determinado.

#### Artículo 19. **Caracterización biológica**

1. La realización de bioensayos será preceptiva para evaluar la aceptabilidad ambiental del vertido al mar de materiales que, una vez clasificados de acuerdo con el artículo 24, no pertenezcan a las categorías A o B y estén representados por muestras cuya concentración supera, al menos para uno de los contaminantes, el nivel de acción B sin superar en ningún caso el nivel de acción C según se establecen en el artículo 22.

2. En caso de que la caracterización química se hubiera llevado a cabo utilizando muestras compuestas, los bioensayos se llevarán a cabo sobre las mismas muestras. Para el caso de muestras individuales, los bioensayos podrán realizarse sobre tales muestras individuales u optarse por su composición tras la etapa de caracterización química y realizar entonces los bioensayos sobre estas nuevas muestras compuestas.

3. A los efectos de la composición de muestras para la caracterización biológica, la misma será únicamente posible cuando las estaciones de muestreo sean contiguas en el espacio y se realizará de acuerdo con el procedimiento establecido en el artículo 14.5.

4. Los resultados de los bioensayos determinarán exclusivamente la clasificación final del material representado por las muestras sobre las que se realizan sin que puedan los mismos extrapolarse a zonas de dragado representadas por otras muestras diferentes, aún en el caso de presentar concentraciones de contaminantes inferiores.

5. Para considerar válida la muestra control, todas las concentraciones de contaminantes analizados en la misma deben resultar inferiores a las establecidas como nivel de acción A en el artículo 22.

6. Para la caracterización biológica se optará por un bioensayo en fase líquida, realizado sobre el lixiviado de fracción de la muestra inferior a 2 mm previamente homogeneizada o por un bioensayo en fase sólida, realizado sobre la fracción de la muestra inferior a 1 mm previamente homogeneizada de acuerdo con la metodología incluida en el Anejo IV.

7. Caso de optarse por un bioensayo en fase líquida, se realizará con la especie *Paracentrotus lividus*, determinándose el éxito de la embriogénesis o el crecimiento larvario, o alternativamente, el éxito de fecundación. Se considerará que la muestra presenta toxicidad negativa cuando el porcentaje medio de éxito en embriogénesis, el crecimiento larvario o la fertilización sea igual o superior a un 70% del detectado en una muestra control.

8. En caso de realizarse el bioensayo sobre fase sólida, éste será de toxicidad aguda en anfípodos pudiendo elegirse entre las especies *Ampelisca brevicornis* o *Corophium sp.* indistintamente. Se considerará que la muestra presenta toxicidad negativa cuando el porcentaje de supervivencia medio sea igual o superior a un 70% del detectado en una muestra control.

#### Artículo 20. **Plazos de validez de los análisis**

1. Con carácter general, los resultados analíticos, y de los bioensayos en su caso, necesarios para la caracterización de los materiales a dragar y su posterior clasificación tendrán un plazo de validez de 4 años.

2. En caso de no comenzarse la ejecución del proyecto en el mencionado plazo podrá ampliarse la validez de los resultados en 4 años adicionales siempre y cuando se proceda a una validación de los mismos mediante una caracterización simplificada.

3. En el caso de dragados de mantenimiento que consistan en actuaciones con plazo de duración total inferior a un año y sean susceptibles de repetirse periódicamente en años sucesivos en idénticas condiciones, se podrá extender la validez de los análisis hasta un número de años no superior a 4.

## Artículo 21. **Caracterización simplificada**

1. Podrá realizarse una caracterización simplificada cuando, contándose con los resultados previos de una caracterización completa realizada de acuerdo a los artículos 15 al 19, el proyecto no se haya iniciado dentro del plazo de validez de los análisis establecido en el artículo 20, siempre que se cumpla:

- Que el dragado se plantee para idéntica zona, o una parte de la misma, sobre la que se realizó una caracterización completa,
- Que no se conozca la existencia de modificaciones significativas en los aportes contaminantes a la misma y posibles modificaciones en los tráficos y así se justifique adecuadamente, y
- Que no se hubieran detectado efectos negativos para el medio ambiente o los usos legítimos del mar en las actuaciones realizadas con anterioridad.

2. La caracterización simplificada de los materiales incluirá una nueva campaña de muestreo en la que se tomarán muestras superficiales de sedimento en un número igual a la tercera parte de estaciones utilizadas en la caracterización previa, elegidas entre las que presenten un mayor nivel de contaminación.

3. En los casos en que alguno de los resultados a validar corresponda a muestras de tipo compuesto, se tomarán muestras individuales en las estaciones de muestreo utilizadas anteriormente y se procederá a la composición de las mismas en idénticas proporciones a las utilizadas en la caracterización completa.

4. Sobre estas muestras, individuales o compuestas, se realizará una caracterización preliminar de acuerdo con el artículo 15 y una caracterización química que incluirá, como mínimo, la determinación de aquellos contaminantes cuya concentración hubiera resultado superior al nivel de acción A en la caracterización completa.

5.- La valoración de los resultados se realizará mediante la comparación de las concentraciones de cada muestra analizada con los obtenidos anteriormente en la caracterización completa.

6. La clasificación del material se mantendrá respecto a la caracterización completa siempre que los nuevos resultados analíticos no determinen el cambio de categoría a una superior para ninguna de las muestras ni las diferencias en el contenido de COT resulten estadísticamente significativas. En caso contrario resultará preceptiva una nueva caracterización completa y subsiguiente clasificación del material acorde a los resultados obtenidos en la misma.



## CAPÍTULO V: CLASIFICACIÓN DEL MATERIAL DRAGADO

### Artículo 22. *Niveles de acción*

La clasificación de los materiales de dragado se realizará por comparación, de acuerdo con los criterios establecidos en el artículo 24, de las concentraciones de contaminantes que presentan con los niveles de acción definidos por las concentraciones incluidas en la tabla 1. Todas las concentraciones están referidas a la fracción no gruesa del sedimento (inferior a 2 mm) y expresadas sobre materia seca:

<b>Tabla 1. NIVELES DE ACCIÓN</b>			
<b>PARÁMETRO</b>	<b>N.A.A</b> (Nivel de Acción A)	<b>N.A.B</b> (Nivel de Acción B)	<b>N.A.C</b> (Nivel de Acción C)
Hg (mg/kg)	0,35	0,71	2,84
Cd (mg/kg)	1,20	2,40	9,60
Pb (mg/kg)	80,0	218	600
Cu (mg/kg)	70,0	168	675
Zn (mg/kg)	205	410	1640
Cr (mg/kg)	140	340	1000
Ni (mg/kg)	30,0	63,0	234
As (mg/kg)	35,0	70,0	280
Σ 7 PCBs (mg/kg) <sup>(1)</sup>	0,05	0,18	0,54
Σ 9 HAPs (mg/kg) <sup>(2)</sup>	1,88	3,76	18,80
TBT <sup>(3)</sup> (mg Sn/kg)	0,05	0,20	1,00
(1) Suma de los congéneres IUPAC números 28, 52, 101, 118, 138, 153 y 180. (2) Suma de los nueve recomendados por OSPAR (Antraceno, Benzo(a)antraceno, Benzo(ghi)perileno, Benzo(a)pireno, Criseno, Fluoranteno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Pireno y Fenantreno) (3) TBT y sus productos de degradación (DBT y MBT). Valores provisionales			

**Artículo 23. Concepto de sedimento no peligroso a efectos de la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados**

1. A efectos del artículo 2.3 de la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados, tendrán la consideración de “sedimentos no peligrosos” aquéllos que cumplan las siguientes condiciones:

- i. Las concentraciones analíticas de contaminantes, expresadas sobre masa seca de sedimento y determinadas de acuerdo con los artículos 17 y 18 no superan los umbrales incluidos en la tabla 2, todos ellos referidos a la fracción no gruesa del sedimento (inferior a 2 mm) y expresados sobre materia seca, con la siguiente excepción:

Los sedimentos que superen los umbrales establecidos en la tabla 2 únicamente en, Cobre y/o Zinc, sin superar un umbral máximo de 10.000 mg/kg, podrán ser objeto de comprobación de su no ecotoxicidad de acuerdo con los métodos y criterios establecidos en la OM de 13 de octubre de 1989 sobre métodos de caracterización de residuos tóxicos y peligrosos. En caso de resultar no ecotóxicos, estos sedimentos tendrán consideración de “sedimentos no peligrosos”.

- ii. Para aquellas muestras en las que la concentración de más de un contaminante supere el nivel de acción C deberá demostrarse, adicionalmente, su no ecotoxicidad de acuerdo con los métodos y criterios establecidos en la OM de 13 de octubre de 1989 sobre métodos de caracterización de residuos tóxicos y peligrosos.

2. Aquellos materiales de dragado que no cumplan las condiciones establecidas en el apartado 1 del presente artículo, deberán ser caracterizados conforme el Anejo III de la ley 22/2011 para comprobar si son o no residuos peligrosos. En caso de que no lo sean, su gestión se realizará conforme a lo establecido en el artículo 27.4 de estas Directrices.

<b>Tabla 2. UMBRALES PARA LA CONSIDERACIÓN DE SEDIMENTO NO PELIGROSO</b>	
<b>PARÁMETRO</b>	<b>Concentración</b>
Hg (mg/kg)	17
Cd (mg/kg)	72
Pb (mg/kg) <sup>(1)</sup>	1000
Cu (mg/kg) <sup>(1)</sup>	2500
Zn (mg/kg) <sup>(1)</sup>	2500
Cr (VI) (mg/kg) <sup>(1)</sup>	1000
Ni (mg/kg) <sup>(1)</sup>	1000
As (mg/kg) <sup>(1)</sup>	1000
Σ 7 PCBs (mg/kg) <sup>(2)</sup>	4,0
Σ 9 HAPs (mg/kg) <sup>(3)</sup>	110
TBT (mg Sn/kg) <sup>(4)</sup>	1,2
Hidrocarburos C10-C40 (mg/kg) <sup>(1)</sup>	2500 <sup>(5)</sup>
<p>(1) Basados en las concentraciones de la Orden MAM 304/2002 y normativa asociada</p> <p>(2) Suma de los congéneres IUPAC números 28, 52, 101, 118, 138, 153 y 180.</p> <p>(3) Suma de los nueve recomendados por OSPAR (Antraceno, Benzo(a)antraceno, Benzo(ghi)perileno, Benzo(a)pireno, Criseno, Fluoranteno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Pireno, y Fenantreno)</p> <p>(4) TBT y sus productos de degradación (DBT y MBT)</p> <p>(5) Valor provisional</p>	

## Artículo 24. **Categorías de los sedimentos no peligrosos**

1. La totalidad del material a dragar correspondiente a un determinado proyecto que, de acuerdo con el artículo 23 tuviera la consideración de sedimento no peligroso, deberá ser clasificado en una o más categorías de las que se establecen en el presente artículo en función de la concentración de contaminantes que presenten y/o de los efectos tóxicos que pudieran producir sobre la biota marina.

2. La clasificación de los materiales en función de la concentración de contaminantes se realizará por comparación de la concentración media de cada contaminante con las establecidas como niveles de acción en el artículo 22.

3. A los efectos del cálculo de concentraciones medias, se seguirá el procedimiento que seguidamente se detalla, con las restricciones de distribución espacial y de concentración que se indican:

3.1. Cada muestra se considerará representativa de una determinada masa de material, que se calculará de acuerdo con la expresión:

$$M_i = C_{Si} \cdot V_i \cdot \left( \frac{PA_i + PF_i}{100} \right)$$

donde:

$C_{Si}$ (t/m <sup>3</sup> )	= Concentración de sólidos en la muestra i (se puede calcular mediante la expresión indicada al respecto en el Anejo IV).
$P_{Ai}$	= Porcentaje de arenas en la muestra i.
$P_{Fi}$	= Porcentaje de finos en la muestra i.
$V_i$ (m <sup>3</sup> )	= Volumen de material a dragar representado por la muestra i.

3.2. La concentración media para cada contaminante se calculará en función de la masa de material representada por cada muestra, de acuerdo con la expresión:

$$C^* = \frac{\sum C_i \cdot M_i}{\sum M_i}$$

donde:

$C^*$  = Concentración media para un contaminante.

$C_i$  = Concentración de contaminante en la muestra  $i$ .

$M_i$  = Masa de sedimentos de la fracción inferior a 2 mm representada por la muestra  $i$ .

3.3. Con independencia de las estaciones en la zona tipo M, cuya representatividad espacial será la establecida en el artículo 11.1, el resto de estaciones de muestreo se considerarán representativas de la superficie correspondiente a un polígono cuyos vértices estarán situados en la intersección de la línea de equidistancia de cada punto con el más cercano en cada dirección (teselación de Voronoi). Para aquellas estaciones ubicadas en la parte más externa de la zona de dragado, dichas líneas de equidistancia se prolongarán hasta intersectar el borde de dicha zona.

3.4. Para el caso de estaciones de muestreo en las que se haya obtenido una columna de sedimentos, la muestra superficial, tomada mediante cuchara, se considerará representativa de los primeros 50 cm del material. A partir de dicha cota, las submuestras procedentes del corer serán representativas del material existente entre la cota a la que fueron adquiridas hasta la cota correspondiente a la submuestra situada inmediatamente más abajo para la que se cuente con resultados analíticos. Cuando la columna de sedimentos no alcance el espesor de dragado proyectado, la submuestra más profunda analizada en el testigo se considerará representativa de un espesor de material igual al existente entre la profundidad a la que corresponde y el espesor de dragado proyectado para ese punto.

3.5. En los casos en que el proyecto de dragado incluya diferentes zonas discontinuas en el espacio, el cálculo de concentraciones medias deberá realizarse por separado para cada una de tales zonas.

3.6. Dentro de cada zona, el cálculo de concentraciones medias únicamente podrá realizarse con aquellas estaciones de muestreo que sean contiguas en el espacio, de manera que se obtengan zonas de dragado homogéneas cuyos materiales puedan técnicamente ser gestionados de manera conjunta.

3.7. Respecto a los resultados analíticos:

- i. No podrán tomarse en consideración aquellos materiales para los que no se cuente con resultados analíticos al haber resultado exentos de caracterización de acuerdo con el artículo 8 o las muestras que hubieran resultado exentas de caracterización química y biológica de acuerdo con el artículo 16.
- ii. Para aquellos resultados analíticos que resulten inferiores al límite de cuantificación, se utilizará como resultado de la medición la mitad de este valor.
- iii. No se considerarán, con carácter general, aquellas muestras para las que la concentración de algún contaminante hubiera resultado superior al nivel de acción C.
- iv. Excepcionalmente podrán considerarse aquellas muestras en las que la concentración de algún contaminante supere el nivel de acción C en menos de un 20%, siempre y cuando se cumplan las condiciones para ser considerado sedimento no peligroso establecidas en el artículo 23 y la masa representada por este conjunto de muestras sea inferior al 10% de la masa total de los materiales para los que se calcula la concentración media.

4. Pertenecen a la **categoría A** los materiales correspondientes a proyectos exentos de caracterización y aquellos materiales representados por muestras que cumplan íntegramente alguno de los siguientes supuestos:

- i. Muestras exentas de caracterización química y biológica conforme al artículo 16.
- ii. Conjunto de muestras no exentas de caracterización química y biológica cuya concentración individual o media sea inferior o igual al nivel de acción A para todos y cada uno de los contaminantes.

Los materiales dragados pertenecientes a esta categoría podrán verterse al mar excepto en las zonas de exclusión.

5. Pertenecen a la **categoría B** aquellos materiales que, no reuniendo los requisitos para ser clasificados como de categoría A, están representados por muestras que cumplen íntegramente alguno de los siguientes supuestos:

- i. La concentración individual o media para todos y cada uno de los contaminantes resulta ser inferior o igual al nivel de acción B.
- ii. La concentración individual o media de algún contaminante resulta ser superior al nivel de acción B siempre que los resultados de la caracterización biológica a la que se refiere el artículo 19 indiquen que presentan una toxicidad negativa para la biota marina.

Los materiales pertenecientes a la categoría B podrán ser vertidos al mar excepto en las zonas de exclusión y las zonas restringidas.

6. El vertido al mar de materiales de categoría A o B deberá ser expresamente autorizado de acuerdo con lo especificado en el Capítulo VIII de las presentes Directrices teniendo en consideración los resultados de un estudio que indique la zona más adecuada para el mismo de manera que se minimicen los posibles efectos negativos de cualquier naturaleza (mecánica, litológica, biológica, sanitaria, etc.).

7. Pertenecen a la **categoría C** aquellos materiales que, no reuniendo los requisitos para ser clasificados como de categoría A o B, están representados por muestras para las que se cumple que:

- i. La concentración individual o media de al menos un contaminante resulta ser superior al nivel de acción B pero inferior o igual al nivel de acción C y no se hubiera realizado caracterización biológica o los resultados de la misma indiquen que presentan toxicidad positiva, o
- ii. La concentración individual o media de al menos un contaminante resulta superior al nivel de acción C y cumple las condiciones para ser considerado sedimento no peligroso establecidas en el artículo 23.

Excepto en el caso de que se sometan a la adecuada técnica de tratamiento que permita la separación o aislamiento de las fracciones contaminadas, los materiales de categoría C podrán ser reubicados en las aguas del DPMT únicamente de manera confinada y su gestión deberá realizarse de acuerdo con lo indicado en el artículo 27.2.

8. Si el promotor de la actuación optase por una técnica de gestión común para materiales clasificados en diferentes categorías, ésta debe de ser la correspondiente a los materiales con un nivel más elevado de contaminación.

9. En caso de resultar clasificado el material en más de una categoría y optarse por una técnica de gestión diferente para los materiales de cada una de ellas, deberá justificarse adecuadamente la viabilidad técnica de la separación de los mismos.



## CAPÍTULO VI: MEDIDAS PREVENTIVAS Y EVALUACIÓN DE LAS OPCIONES DE GESTIÓN

### Artículo 25. *Medidas preventivas y mitigación de efectos negativos*

En el Anejo V de las presentes Directrices se desarrollan con detalle las diferentes medidas a adoptar si se prevé que pudieran existir efectos negativos sobre el medio marino, así como el uso de las mejores prácticas ambientales con objeto de minimizar tales efectos.

### Artículo 26. *Estudio de los usos productivos*

1. Para todo el material dragado considerado sedimento no peligroso, incluyendo aquellos proyectos exentos de caracterización y los materiales exentos de caracterización química y biológica, deberá realizarse un estudio sobre alternativas de usos productivos frente a su vertido al mar.

2. Dicho estudio será incorporado al proyecto, formará parte de la documentación necesaria para la obtención de los correspondientes permisos e incluirá un análisis de los posibles usos productivos a los que pudiera ser destinado el material de acuerdo con lo indicado en el Anejo VI.

3. Para aquel material dragado que reúna las características granulométricas y de calidad ambiental adecuadas de acuerdo con su normativa específica, se considerará su aporte a playas como el uso productivo preferente. En estos casos, el promotor del dragado pondrá a disposición de la autoridad competente en materia de costas, previo acuerdo con la misma, el material que ésta estime conveniente.

4. Si con la información existente sobre el proyecto del dragado, las características de la zona a dragar, la caracterización del material según las presentes Directrices y estudiados los posibles usos del mismo se decidiera dar un uso productivo al material dragado, el promotor del dragado pondrá a disposición del órgano competente, y previo acuerdo con el mismo, dicho material.

5. Si, por el contrario, se conviniera en la imposibilidad de dar un uso productivo al material dragado, se deberán justificar adecuadamente los motivos de esta decisión, con mención

expresa a alguna de las causas siguientes:

- Imposibilidad legal, técnica u operativa de utilizar el material dragado para un uso productivo.
- No aceptación del órgano competente, señalando expresamente los motivos por los que no se llegó a un acuerdo.
- Otras razones tenidas en consideración por el promotor.

#### Artículo 27. **Opciones de gestión para el material dragado**

1. Los materiales de dragado pertenecientes a la categoría A podrán ser vertidos al mar en zonas restringidas o no restringidas. En el caso de los materiales de la categoría B el vertido se podrá efectuar exclusivamente fuera de las zonas de vertido restringidas.

2. Los materiales pertenecientes a la Categoría C podrán ser reubicados en el DPMT únicamente mediante una técnica de confinamiento en recinto o considerar otras opciones para su gestión entre las que pueden incluirse:

2.1. Recubrimiento o confinamiento subacuático. Implica la colocación muy precisa de material dragado en el fondo marino, pudiéndose emplear algún dispositivo de confinamiento lateral, seguida del recubrimiento con un material limpio que tiene funciones de aislamiento. Los confinamientos subacuáticos deberán diseñarse, construirse y gestionarse de manera que los contaminantes presentes en el material no puedan incorporarse al medio marino provocando un deterioro en el buen estado ecológico o ambiental del mismo. Se deberá prestar especial atención a su estabilidad mecánica en función de las condiciones hidrodinámicas existentes en la zona de depósito y a la protección de las aguas. Con carácter general, se deberán tomar las medidas adecuadas para asegurar la mínima dispersión durante la colocación, garantizando su estabilidad y precisa ubicación del material en el emplazamiento confinado.

Los fondos marinos que hayan sido objeto de esta técnica, deberán preservarse de todas aquellas acciones humanas que impliquen el deterioro de la capa de cobertura. Para ello, las autoridades competentes en la gestión del mar y de sus recursos deberán tener en cuenta estas zonas en los posibles procedimientos de autorización

de las actividades que comprometan dicho recubrimiento, tales como, por ejemplo, la pesca de arrastre, la colocación de emisarios submarinos, la cimentación de parques eólicos o el tendido de cables submarinos. Así mismo, a la finalización de la actuación de recubrimiento o confinamiento subacuático, el promotor deberá informar al órgano competente en materia de cartografía marina sobre la ubicación geográfica y superficie de la zona en la que se ha aplicado esta técnica, así como, en su caso, de las modificaciones batimétricas significativas que hubieran podido producirse.

2.2. Relleno de estructuras portuarias, para el que resultará de aplicación lo establecido en el artículo 28 referente al confinamiento en recintos.

2.3. Técnicas de tratamiento: pretratamiento (separación de las fracciones del material dragado o separación del agua de los sólidos mediante balsas de sedimentación, hidrociclones y membranas), tratamiento biológico (degradación de sustancias orgánicas por microorganismos), tratamiento químico (ajustes de pH, oxidación, intercambio iónico, etc.), tratamiento térmico (desorción térmica, incineración, reducción térmica, vitrificación) e inmovilización (fijación, solidificación, etc.).

3. En caso de optarse para material perteneciente a la Categoría C por una técnica de tratamiento, el mismo podrá ser considerado como susceptible de vertido al mar únicamente en el caso de procederse, tras la aplicación de dicha técnica, a una nueva caracterización química y, en su caso, biológica de acuerdo con los artículos 17 y 19 y resultar entonces clasificado como de Categoría A o B. Se considerarán, a estos efectos, los resultados de los ensayos experimentales necesarios, realizados a una escala adecuada, que permitan anticipar los resultados obtenidos por la técnica de tratamiento, sin menoscabo del control de la calidad de los materiales durante la ejecución material de la operación de acuerdo con lo especificado en el artículo 46.3.

4. Para aquellos materiales que, superando para algún contaminante el nivel establecido en la tabla 2 del artículo 23, fueran considerados sedimentos no peligrosos o residuos no peligrosos de acuerdo con el artículo 23, su reubicación en el DPMT será posible únicamente mediante su almacenamiento en recintos específicamente construidos para el almacenamiento de productos contaminados, con paredes impermeables y dispositivos que permitan controlar la fuga de lixiviados.

5. Sin perjuicio de otra normativa que pudiera resultar de aplicación, se deberá garantizar que, en caso de que el relleno o confinamiento generen una superficie seca por encima de

la lámina de agua, los materiales emergidos no cumplen las condiciones para clasificar el emplazamiento como un suelo contaminado conforme a lo establecido en el Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados.

6. La selección de la técnica de gestión se realizará mediante un estudio comparativo entre la tecnología de dragado más moderna disponible y su coste económico y los aspectos ambientales, considerando además la viabilidad técnica de la actuación y las características del programa de vigilancia ambiental.

#### Artículo 28. **Confinamiento en recintos**

1. El diseño y construcción de los recintos deberán cumplir los siguientes requisitos:

1.1. Volumen de almacenamiento adecuado, teniendo en cuenta todos los procesos por los que va a pasar el material dragado durante su estancia en el recinto, el ritmo de dragados que se piensa seguir, etc. El volumen del recinto deberá calcularse teniendo en cuenta no sólo el volumen ocupado por el material sólido dragado, sino también por el agua recogida durante el mismo (en caso de relleno hidráulico) y eventuales precipitaciones, rebase por oleaje, etc y por el volumen libre entre la superficie del agua y la coronación de los diques, y cuyo objetivo es asegurar un francobordo mínimo.

1.2. Área del recinto adecuada para que, con el ritmo de llenado previsto, se produzca la sedimentación suficiente (natural o incentivada mediante floculantes) para que el efluente que rebose por los aliviaderos durante el llenado del recinto cumpla los criterios de calidad establecidos.

1.3. Aliviaderos adecuados para permitir la eliminación del agua sobrenadante después de los procesos de decantación, debiéndose cumplir que:

- i. Su capacidad sea suficiente como para garantizar la eliminación efectiva del sobrenadante durante el relleno sin la resuspensión excesiva del material depositado;

- ii. Su cota permita controlar la altura de la lámina de agua, el tiempo de retención de los sólidos y, por tanto, la concentración de sólidos en suspensión del efluente;
- iii. Su forma, que será tal que ocupe la superficie mínima imprescindible, siempre y cuando se optimice la longitud efectiva de alivio;
- iv. La descarga es subacuática y se realiza a la menor distancia posible del fondo;
- v. Se deberán disponer, asimismo, aliviaderos específicos para la evacuación de aguas de tormenta, rebases de oleaje o cualquier otra aportación líquida ajena al dragado;
- vi. En el diseño de los aliviaderos superficiales se deberá tener en cuenta la necesaria protección de los paramentos del recinto.

1.4. Diques de contención adecuados que, además de cumplir los requerimientos de estabilidad y resistencia, tengan una permeabilidad suficientemente reducida para impedir la salida de partículas sólidas. En las hipótesis de diseño se deberá tener en cuenta la variabilidad de las solicitaciones debidas a las diferencias de carga durante las fases de explotación, considerándose de manera particular las diferentes superficies de deslizamiento y la protección frente al oleaje<sup>2</sup>.

1.5. Deberá vigilarse, especialmente durante la construcción, que no se produzcan vías de salida rápida del material del recinto (sólido o líquido) atravesando la barrera de permeabilidad reducida.

2. La gestión de los recintos deberá seguir las normas de explotación establecidas al efecto en función del tipo y tamaño del mismo y las características de los materiales a almacenar, así como la normativa que resulte de aplicación. Los principales aspectos que se incluirán en tales normas de explotación son:

- i. Operaciones de llenado: métodos de llenado, ocupación de espacios y planificación del orden de las capas.

---

<sup>2</sup> En el proyecto de recintos se considerarán las recomendaciones de la ROM 0.5-05 Recomendación Geotécnica para las obras marítima y/o portuaria así como la normativa técnica de presas y embalses y balsas de residuos mineros que pudieran resultar de aplicación al caso.

- ii. Gestión del balance de agua: profundidad mínima de almacenamiento y control de los niveles de agua.
- iii. Programa de seguimiento y vigilancia ambiental, para lo que se atenderá a lo especificado en el Capítulo IX.
- iv. Plan de actuación ante situaciones de emergencia ambiental.

## CAPÍTULO VII: REUBICACIÓN DEL MATERIAL DRAGADO EN EL MAR

### Artículo 29. *Evaluación de las zonas de vertido*

1. Para aquellos materiales pertenecientes a las categorías A o B y cuya alternativa de gestión resulte ser el vertido al mar, el promotor de la actuación deberá proceder a la selección de la zona más adecuada para el mismo. Para considerar y evaluar las diferentes alternativas se deberá disponer de la siguiente información referente a cada zona y su entorno.

- i. Características batimétricas de la zona.
- ii. Características biológicas, con especial atención a los hábitats y especies, especialmente bentónicos, y prestando particular atención a la existencia hábitats marinos de alto valor ecológico, como p. ej. praderas de fanerógamas marinas, comunidades de maërl y coralígeno.
- iii. Localización de áreas amparadas por cualquier figura de protección autonómica, nacional o internacional, con determinación expresa de la distancia mínima hasta las mismas.
- iv. Identificación de otros usos legítimos del mar que pudieran resultar afectados por la actuación, con especial atención a la existencia de zonas sensibles y caladeros de pesca.
- v. Identificación de zonas degradadas, especialmente zonas de vertido de material dragado o de cualquier otro tipo de desecho, o contaminadas e información sobre las causas que originaron dicha situación y los contaminantes implicados.

2. Cuando esté disponible tal información, para la preselección de posibles zonas de vertido se tendrá en cuenta, además de la información a la que hace referencia el apartado anterior, la siguiente:

- i. Características hidrodinámicas de la zona, con especial atención a la existencia de corrientes de densidad.
- ii. Características granulométricas y de calidad ambiental del sedimento.
- iii. Calidad de las aguas.

3. En la preselección de zonas de vertido se tendrán también en consideración los criterios a los que hacen referencia los artículos 33 y 34.

4. En actuaciones que, por las características hidrodinámicas de la zona y proximidad a zonas sensibles, pudiera producirse un efecto negativo sobre las mismas, será preceptiva la realización de un estudio de transporte y dispersión que permita cuantificar tal afección. Dicho estudio deberá basarse en un adecuado conocimiento del clima marítimo.

5. Sobre la zona finalmente seleccionada y cuando no se disponga de la información necesaria a través de estudios previos en la misma, se deberá proceder a la realización de campañas de reconocimiento y de toma de datos y muestras en campo con el siguiente alcance:

- i. Levantamiento batimétrico.
- ii. Estudio de las características fisicoquímicas de las masas de agua (Temperatura, Salinidad, Oxígeno Disuelto, pH, Potencial Rédox, Clorofila y Turbidez) en una malla de estaciones de medida repartidas convenientemente por toda la zona de estudio. En cada estación de medida se determinarán estos parámetros preferentemente mediante sonda multiparamétrica, sensores sumergibles con registro en continuo o métodos similares desde superficie hasta el fondo cada cierto intervalo de metros.

Se tomarán además muestras de agua, representativas de toda la columna, sobre las que se realizarán las siguientes determinaciones analíticas: Sólidos en Suspensión, Nitrógeno Total, Fosfatos, Carbono orgánico oxidable, Metales (Mercurio, Cadmio, Plomo, Cobre, Zinc, Cromo y Níquel), Arsénico, parámetros indicadores de contaminación fecal incluidos en la normativa estatal o autonómica que resulte de aplicación y, si los análisis de los materiales a dragar han puesto de manifiesto la presencia significativa de algún otro contaminante hidrosoluble, se procederá a su análisis.

Para la realización de medidas de calidad fisicoquímica y toma de muestras de agua se utilizará, como mínimo, una estación de muestreo situada en el centro de la zona de vertido propuesta.

- iii. Estudio de calidad sedimentológica. En un mínimo de 3 estaciones de muestreo, distribuidas uniformemente sobre la zona de vertido propuesta se procederá a la adquisición de muestras de sedimento superficial sobre las que se realizará un análisis granulométrico y se determinará, como mínimo, el contenido en: COT, Metales (Mercurio, Cadmio, Plomo, Cobre, Zinc, Cromo y Níquel), Arsénico, PCBs y HAPs.



- iv. Cuando existan zonas sensibles en el entorno de la zona propuesta para el vertido, resultarán preceptivos en las mismas los estudios de calidad de las masas de agua y calidad sedimentológica a los que se refieren los apartados anteriores, así como un estudio de corrientes para conocer y cuantificar las posibles afecciones derivadas del vertido sobre las zonas cercanas teniendo en cuenta las características de sedimentación del material a verter.
- v. Caracterización bionómica de acuerdo con la metodología incluida en el Anejo III.

### Artículo 30. ***Análisis de espacios protegidos en el entorno***

1. Se realizará un inventario de los espacios naturales protegidos, los incluidos en la Red Natura 2000 o con cualquier figura de protección autonómica, nacional o internacional, existentes en el entorno de la zona de reubicación, con indicación de su localización respecto a la misma, los valores ambientales que fueron tenidos en cuenta para su catalogación o hábitats o especies prioritarios localizados en sus programas de seguimiento y los objetivos de conservación de los mismos, así como la estimación de la probabilidad de que el vertido o colocación les pudiera afectar atendiendo a la dispersión de los sedimentos en función del hidrodinamismo de la zona.

2. Se asegurará que las actuaciones de reubicación de los materiales resultan compatibles con los objetivos de conservación de estos espacios.

### Artículo 31. ***Clasificación de la zona de vertido***

1. A los efectos de evaluar la zona más adecuada para la reubicación del material dragado, el medio marino se clasificará en:

1.1.- Zonas de exclusión: Aquella parte del DPMT cuyo fondo esté constituido por praderas de fanerógamas marinas, bosques de laminarias, comunidades de maërl o formaciones de coralígeno, zonas de baño, zonas de cultivos marinos, bancos marisqueros y las ocupadas por cualquier infraestructura submarina. En estas zonas no podrá ser autorizado el vertido de materiales, limitándose su colocación en estas zonas únicamente a un uso productivo.

1.2.- Zonas de vertido restringidas: Aquellas que reúnan al menos uno de los siguientes requisitos:

- i. Profundidad igual o inferior a 25 metros.
- ii. Zonas marinas o marítimo-terrestres protegidas en virtud de la legislación autonómica, nacional o internacional y, en su entorno, hasta una distancia igual a 2 millas náuticas del límite exterior de las mismas.
- iii. Entorno de las zonas de exclusión hasta una distancia igual a 2 millas náuticas desde el borde exterior de las mismas.

1.3. - Zonas de vertido no restringidas: resto del medio marino.

2. Siempre y cuando la normativa específica de conservación de estos espacios no indique lo contrario, no tendrán la consideración de zonas de exclusión o restringidas aquellas que estén histórica o tradicionalmente autorizadas para el vertido de material dragado, previa justificación de que los vertidos realizados con anterioridad no han tenido efectos negativos significativos sobre la calidad del medio marino u otros usos legítimos del mar.

#### Artículo 32. ***Evaluación de las zonas para confinamiento subacuático***

Para aquellos materiales pertenecientes a la categoría C y cuya alternativa de gestión resulte ser el confinamiento subacuático, el promotor de la actuación deberá proceder a la selección de la zona más adecuada para el mismo. Para ello se recopilará la misma información que la incluida como necesaria para la evaluación de las zonas de vertido en los artículos 29 y 30.

Adicionalmente, para la zona finalmente seleccionada y cuando no se disponga de la información necesaria a través de estudios previos en la misma, resultará preceptiva la realización de un estudio sobre las características hidrodinámicas de la zona, con especial atención a la existencia de corrientes de cualquier tipo, de manera que se pueda asegurar la mínima dispersión del material durante la fase de depósito y la estabilidad de la capa de recubrimiento.

### Artículo 33. **Selección de la zona de reubicación**

1. Se justificará la selección final de la zona de reubicación teniendo en cuenta tanto los condicionantes técnicos como ambientales y socioeconómicos, de manera que se consiga una solución que permita la compatibilidad de la actuación con la conservación del buen estado ambiental del medio marino y el buen estado ecológico de las aguas costeras y de transición (o el buen potencial ecológico en el caso de masas de agua muy modificadas) en el entorno del área de actuación, así como con sus diferentes usos legítimos.

2. Para la selección de la zona de reubicación se tendrá en cuenta que los potenciales impactos sobre el medio marino, según se indican en el artículo 34, sean los menores posibles.

3. Para las zonas de vertido y en ausencia de otros criterios ambientales o de interferencia con otros usos legítimos del medio marino, se considerará de manera preferente aquella alternativa en la que los materiales del fondo presenten unas características granulométricas similares a los materiales a verter.

4. Las zonas de vertido que anteriormente hubieran sido debidamente autorizadas para el vertido del material dragado serán utilizadas preferentemente frente al establecimiento de nuevas zonas de vertido. En estas ocasiones se requerirá de un estudio que permita valorar los efectos ambientales de los vertidos anteriormente realizados en las mismas.

5. El estudio al que hace referencia el apartado anterior tendrá un plazo de validez máximo de 5 años, debiendo actualizarse una vez cumplido dicho plazo o cuando desde el momento de su realización se hubiera vertido en la zona un volumen de material superior a 1.000.000 m<sup>3</sup> correspondiente a proyectos anteriores.

### Artículo 34. **Evaluación de los efectos ambientales**

Teniendo en cuenta las características del material y de la zona elegida para realizar su reubicación, así como la técnica a emplear para realizar la misma, el proyecto deberá incorporar una evaluación de los impactos ambientales de la reubicación del material dragado que considere:

i. Efectos mecánicos directos o indirectos de la reubicación de los materiales sobre la superficie del fondo marino:

- Enterramiento de comunidades biológicas;
- Enterramiento de estructuras producidas por procesos geológicos e hidrológicos de larga duración (cañones, depresiones, surgencias, etc.);
- Enterramiento de estructuras construidas o colocadas sobre el fondo (arrecifes artificiales, emisarios submarinos, cables, conducciones submarinas, etc.);
- Enterramiento de elementos arqueológicos;
- Formación de elevaciones del fondo que puedan influir en la navegación o modificar de forma significativa la batimetría o las corrientes de fondo.

ii. Efectos debidos al comportamiento sedimentológico de los materiales:

- Alteración de las características litológicas, tanto texturales como granulométricas, de la capa superficial de los fondos;
- Alteración del contenido en materia orgánica;
- Desplazamiento o movimiento de los sedimentos depositados en el fondo por efecto de las corrientes;
- Posibles efectos negativos de los sólidos en suspensión durante o con posterioridad al depósito (sobre hábitats o especies, zonas de cultivos marinos, zonas con uso turístico o recreativo, etc.) próximas al área de reubicación. Se tendrán en cuenta los posibles efectos acumulativos o sinérgicos con otras fuentes de sólidos en suspensión.

iii. Efectos debidos a la calidad de los materiales:

Posible incorporación al medio acuático de contaminantes (materia orgánica, nutrientes, metales, contaminantes de origen fecal, etc.) o especies invasoras que pudieran contener los materiales, debiéndose justificar adecuadamente que no existe deterioro en el buen estado de acuerdo con los criterios de la Demarcación Hidrográfica o Demarcación Marina correspondiente.

iv. Efectos sobre la dinámica litoral:

Posible incorporación de los sedimentos a los movimientos generales de la dinámica litoral de la zona pudiendo producir fenómenos de aterramiento o deterioro de la calidad de los materiales transportados por la misma, con especial atención al deterioro de la calidad de los sedimentos que pudieran llegar a zonas de baño, bancos marisqueros o zonas de acuicultura.

#### Artículo 35. ***Gestión de la operación de reubicación***

1. La operación de reubicación deberá realizarse de manera que se minimicen sus posibles efectos negativos.

2. Durante la operación deberá asegurarse que:

- i. El depósito de los materiales se realiza en la zona autorizada a tal fin y se minimice su dispersión fuera de la misma. Resultará recomendable, a estos efectos, que la planificación de la actuación se realice teniendo en cuenta los resultados de los sistemas operacionales de predicción oceánica actualmente en uso y las condiciones meteorológicas existentes en el momento de realizar el depósito.
- ii. Los residuos sólidos de origen antrópico que pudiera contener el material dragado hayan sido adecuadamente separados previamente para su gestión en tierra.
- iii. No se producen pérdidas del material dragado durante el transporte hacia la zona de depósito, ni por rebose del material en la cántara ni como consecuencia de la falta de estanqueidad de las compuertas de vertido de la draga.
- iv. Se cumplen las condiciones generales y específicas, así como las medidas de protección ambiental que se impongan en la autorización de reubicación.

3. Las comprobaciones a las que hace referencia el apartado 2 se realizarán durante la ejecución del programa de vigilancia ambiental según lo indicado en el Capítulo IX.

## CAPÍTULO VIII: PERMISOS Y AUTORIZACIONES

### Artículo 36. **Informes, permisos y autorizaciones derivados de los procedimientos de evaluación ambiental**

1. Las disposiciones contenidas en el presente Capítulo no prejuzgarán los necesarios informes, permisos y autorizaciones que puedan derivarse de los procedimientos de evaluación ambiental a que deban ser sometidos determinados proyectos en virtud de la legislación estatal o autonómica que resulte de aplicación.
2. En el caso de que el proyecto sea sometido a procedimiento de evaluación de impacto ambiental ordinaria o simplificada, los diferentes estudios e informes previstos en el presente Capítulo que sean emitidos antes de que finalice el procedimiento de evaluación de impacto ambiental formarán parte integrante del mencionado procedimiento.
3. Las autorizaciones para el dragado y la reubicación de los materiales en el DPMT incorporarán en su condicionado las determinaciones que, en su caso, se establezcan en la declaración de impacto ambiental, informe de impacto ambiental o en la adecuada evaluación de los efectos sobre la Red Natura 2000 correspondientes.

### Artículo 37. **Compatibilidad con la Estrategia Marina**

1. Las obras de dragado y la reubicación del material dragado en el DPMT requerirán informe previo favorable del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, a los efectos de determinar su compatibilidad con la Estrategia marina correspondiente.
2. Las autorizaciones para el dragado y la reubicación de los materiales en el DPMT incorporarán en su condicionado las determinaciones que, en su caso, se establezcan en el informe de compatibilidad con la Estrategia marina.

### Artículo 38. **Operaciones de dragado y de reubicación de material dragado en puertos**

1. Toda ejecución de obras de dragado y la reubicación del material dragado en el dominio público portuario requerirá autorización de la Autoridad Portuaria.

2. Los permisos necesarios para las operaciones de dragado y de reubicación del material dragado en el interior de puertos de competencia de las Comunidades Autónomas corresponderán a éstas.
  
3. Cuando las obras de dragado, colocación o el vertido del material dragado puedan afectar a la seguridad de la navegación en la zona portuaria, particularmente en los canales de acceso y en las zonas de fondeo y maniobra, se exigirá informe previo y favorable de la Administración marítima.
  
4. Cuando el material o una parte de mismo sea utilizado para la regeneración de playas se exigirá informe previo y favorable de la autoridad competente en materia de costas.
  
5. Se incorporará al proyecto de dragado portuario, cuando proceda, un estudio sobre la posible localización de restos arqueológicos que se someterán a informe de la Administración competente en materia de arqueología.

#### Artículo 39. ***Operaciones de dragado fuera de puertos***

1. Las obras de dragado que se pudieran ejecutar fuera del dominio público portuario o de las aguas portuarias de puertos de competencia de las Comunidades Autónomas requerirán autorización de la autoridad competente en materia de costas. El proyecto incorporará un estudio de evaluación de sus efectos sobre la dinámica litoral y la biosfera marina, que se someterá a informe de las Administraciones competentes en materia de pesca y medio ambiente con carácter previo a su autorización.
  
2. Los proyectos de dragado incluirán un estudio de caracterización y gestión de los productos de dragado, y en particular la localización, en su caso, de la zona o zonas de reubicación de los materiales y su tratamiento de acuerdo con los procedimientos establecidos en las presentes Directrices.

#### **Artículo 40. Operaciones de reubicación fuera de puertos**

1. El vertido al mar del material dragado fuera de las aguas de la zona de servicio del puerto deberá ser autorizado por la Administración marítima, previo informe favorable de la autoridad competente en materia de costas.

2. La autorización a que hace referencia el apartado anterior podrá ser denegada en caso de que la Administración marítima determinase que existen oportunidades adecuadas para la reutilización, reciclado o tratamiento del material sin riesgo para la salud humana o el medio ambiente y sin que suponga un coste desproporcionado.

3. Las operaciones de colocación de material dragado fuera de las aguas de la zona de servicio del puerto deberán ser autorizadas por la autoridad competente en materia de costas previo informe favorable de la Administración marítima en relación con las afecciones a la seguridad de la navegación.

4. Deberán efectuarse los estudios o análisis necesarios que permitan valorar los efectos del vertido o colocación sobre la sedimentología litoral y la biosfera submarina, así como, en su caso, la capacidad contaminante de los vertidos de acuerdo con los procedimientos establecidos en las presentes Directrices, y se someterán a informe de las Administraciones competentes en materia de medio ambiente y de pesca.

#### **Artículo 41. Evaluación de las opciones de gestión del material dragado**

La evaluación de las opciones de gestión del material dragado, incluyendo las medidas preventivas, correctoras o compensatorias, corresponderá a la autoridad que sea competente para otorgar el permiso de dragado y, en su caso, de colocación o vertido teniendo en cuenta la propuesta del promotor realizada de acuerdo con los criterios establecidos en los Capítulos VI y VII de las presentes Directrices.

#### **Artículo 42. Autorización de reubicación para dragados de mantenimiento**

Para el caso exclusivo de dragados repetitivos de una misma zona que tengan por objeto únicamente la restitución de calados (dragados de mantenimiento), la autorización de



colocación o vertido podrá tener un carácter plurianual, siempre y cuando se respeten los procedimientos de caracterización previstos en el Capítulo IV de las presentes Directrices y se cumplan los requisitos indicados al respecto en el artículo 20 sobre plazos de validez de análisis.

#### Artículo 43. ***Finalización de las operaciones de reubicación***

1. Una vez finalizadas las operaciones de colocación o vertido del material dragado, el promotor remitirá a la autoridad que otorgó el permiso y al Centro Directivo del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente competente en materia de seguimiento de los convenios internacionales de protección del medio marino para el preceptivo informe a los mismos, la siguiente información:

- Tipo de área dragada (puerto, estuario o mar abierto).
- Tipo de dragado (primer establecimiento, mantenimiento, etc.).
- Superficie, expresada en m<sup>2</sup>, del área dragada.
- Usos productivos que, en su caso, se ha dado a todo o parte del material, con indicación del volumen destinado a cada uno de los mismos.
- Localización de la zona de vertido o colocación, con indicación de sus coordenadas geográficas y su profundidad.
- Cantidad efectiva colocada o vertida, expresada como volumen y masa.
- Características físicas del material.
- Carga contaminante, expresada como concentración media y cantidad total colocada o vertida para cada uno de los contaminantes analizados.
- Métodos analíticos utilizados en la caracterización química, con indicación de los límites de cuantificación utilizados para cada contaminante, los posibles ejercicios de intercalibración en los que hubiese participado el laboratorio y, en su caso, los materiales de referencia utilizados por el mismo para el aseguramiento de la calidad de las medidas, según se detalla en el Anejo IV de las presentes Directrices.
- Descripción de los bioensayos que pudieran haberse realizado y sus resultados.
- Duración de las operaciones de colocación o vertido, con indicación de las fechas de comienzo y finalización.
- Superficie efectiva sobre la que se ha ejecutado la operación de colocación o vertido.

- Resultados del seguimiento ambiental de las actuaciones, tanto durante la ejecución de la obra como los que pudieran realizarse para evaluar su evolución.
2. En los casos de proyectos de dragado cuya ejecución se extienda en más de un año natural, la información anterior deberá remitirse a la finalización de cada año e incluirá los datos correspondientes a esa anualidad y los totales desde el inicio de la ejecución del proyecto.
3. El Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente en colaboración con la autoridad marítima pondrá a la disposición de los promotores a través de su página web un formulario normalizado para que estos remitan la información anterior, que deberá ser actualizado periódicamente en función de los requerimientos de los convenios internacionales de protección del medio marino.
4. La información anterior tendrá la consideración de información de carácter ambiental y será puesta a disposición de cualquier interesado, para lo que se publicarán resúmenes periódicos, como mínimo con carácter anual, en la página web del Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente.

## CAPÍTULO IX: VIGILANCIA AMBIENTAL

### Artículo 44. *Programa de vigilancia ambiental*

1. Resultará obligatorio el desarrollo por parte del promotor de un programa de vigilancia ambiental en la zona de dragado para aquellos proyectos que impliquen la retirada de materiales clasificados como de categoría C y, con independencia de la clasificación de los materiales, en el caso de la existencia de zonas sensibles en las proximidades que pudieran verse indirectamente afectadas por la actuación de dragado.

2. El vertido o colocación en el mar de material dragado requerirá, en todos los casos, la realización de un programa de vigilancia ambiental acorde a la magnitud del proyecto, las características de los materiales y las particularidades de la zona donde se ejecuta la técnica de gestión.

3. El programa de vigilancia ambiental incluirá los controles necesarios para verificar que la ejecución de las operaciones se ajusta a lo establecido en el proyecto, el cumplimiento de las condiciones que hubieran podido establecerse en la autorización y la no aparición de efectos diferentes a los previstos.

4. El programa de vigilancia ambiental deberá ser sometido a revisiones periódicas y análisis de los parámetros a controlar y/o periodicidad de los controles, en función de los resultados que vayan obteniéndose, al objeto de constatar su eficacia y garantizar su funcionalidad.

5. El programa de vigilancia ambiental definirá los órganos responsables de su cumplimiento y control y establecerá la estructura y organización necesarias para la vigilancia ambiental.

### Artículo 45. *Vigilancia durante la operación de dragado*

1. El programa de vigilancia ambiental durante la operación de dragado deberá asegurar que se controlan los siguientes aspectos:

- i. Operatividad de la ejecución de la operación de dragado, en cuanto al correcto estado y funcionamiento de los medios utilizados para su ejecución,

al procedimiento de ejecución del dragado, al transporte de los materiales y a la supervisión de la correcta gestión de los residuos generados por el dragado y de restos arqueológicos que pudiera contener el material dragado.

- ii. Retirada y adecuada gestión en tierra de los residuos sólidos relevantes de origen antrópico que pudiera contener el material dragado.
- iii. Control preciso del posicionamiento de la draga mediante la utilización de GPS diferencial que asegure que se está dragando dentro de los límites de la zona convenida y correcta en cada instante de la operación de dragado.
- iv. Control de los efectos sobre la calidad de la masa de agua o las zonas sensibles que pudieran existir en el entorno.

2. Dependiendo de las características de la zona de dragado y su entorno, podrá incluir los siguientes controles:

- i. Calidad de las aguas, preferentemente mediante la monitorización en continuo, en lo referente a la turbidez generada por la operación de dragado y la calidad fisicoquímica. Se incluirá un control microbiológico en caso de existir zonas de baño, de cultivos marinos o con cualquier figura de protección ambiental próximas a la zona de dragado.
- ii. Posibles afecciones a los hábitats o especies protegidas, con especial atención a la deposición sobre los mismos de material particulado.
- iii. En el caso de proximidad a caladeros o a zonas de marisqueo, seguimiento de los efectos sobre los recursos pesqueros y marisqueros.
- iv. Efectos sobre el patrimonio arqueológico, en cuanto a que la actuación no provoca daños al patrimonio arqueológico no catalogado en el caso de zonas de dragado próximas a zonas de interés arqueológico.
- v. Efectos sobre las infraestructuras y servicios en el caso de existir estas próximas a la zona de dragado.

3. Cuando resulte relevante, para los aspectos de los apartados 1 y 2 se deberá establecer como mínimo un indicador con el que expresar su comportamiento ambiental. Para los indicadores ambientales que requieran de toma de muestras o de medidas de campo se definirá un programa de muestreo y medición representativo, tanto de la zona de actuación como de su área de influencia y de las zonas sensibles que pudieran existir en el entorno, con indicación de la frecuencia temporal con que se realizarán las medidas y la toma de muestras así como de los parámetros a determinar sobre cada una de las muestras.

4. Una vez definidos los indicadores ambientales, deberán establecerse escalas de valoración para realizar un seguimiento efectivo del grado de alteración del medio y estimar el grado de recuperación de la calidad del mismo tras la finalización del proyecto.

5 Se establecerán, en su caso, umbrales o condiciones límite para los indicadores ambientales que determinen la necesidad de adoptar medidas complementarias que minimicen los efectos no deseados inducidos por la ejecución del dragado. Para el establecimiento de tales condiciones límite se utilizarán requisitos normativos y criterios que sirvieron para definir el buen estado ambiental y los objetivos ambientales de la estrategia marina correspondiente. Como norma general, y siempre que sea posible, estos criterios deben ser numéricos aunque en ausencia de estos, pueden establecerse criterios de aceptación y de rechazo.

6. Se definirán las medidas complementarias y/o correctoras a aplicar en el caso de que se superen los valores máximos establecidos como permisibles para los indicadores ambientales de control.

#### Artículo 46. ***Vigilancia durante la operación de vertido***

1. El programa de vigilancia ambiental durante la operación de vertido al mar de los materiales deberá asegurar el control de la operación de vertido y sus efectos ambientales, así como el cumplimiento de las condiciones que pudieran haberse incluido en la autorización de vertido.

2. Se garantizará que la descarga del material dragado se realiza dentro de la zona autorizada, con los medios o sistemas proyectados y conforme a los plazos y fechas previstas.

3. Dependiendo de las características de los materiales y de la zona de vertido y su entorno, podrá incluir los siguientes controles:

- i. Calidad de los materiales, exclusivamente en los casos de vertido al mar de material dragado que hubiera resultado clasificado como Categoría C y se hubiera sometido a las correspondientes técnicas de tratamiento de acuerdo

con el artículo 27.3. En estos casos se tomarán periódicamente muestras del material y se realizarán los análisis necesarios para asegurar que se alcanzan los resultados previstos por la técnica de tratamiento.

- ii. Presencia significativa de residuos sólidos de origen antrópico, estableciéndose en su caso los medios necesarios para su retirada y adecuada gestión en tierra.
- iii. Calidad de las aguas, preferentemente mediante la monitorización en continuo, en lo que se refiere a la turbidez generada por la operación de vertido y a la calidad fisicoquímica. Se incluirá un control microbiológico en caso de existir zonas de baño, de cultivos marinos o con cualquier figura de protección ambiental próximas a la zona de vertido.
- iv. Estado de hábitats o especies protegidas del entorno, con especial atención a la deposición sobre los mismos de material particulado.
- v. Para operaciones de vertido de un volumen superior a 250.000 m<sup>3</sup>, posible movilidad de los sedimentos vertidos mediante la realización de una batimetría y/o un reconocimiento mediante sonar de barrido lateral de los fondos de la zona de vertido una vez que se lleve a cabo una parte significativa de la operación y a la finalización del mismo.
- vi. En el caso de proximidad a caladeros de la flota pesquera artesanal, seguimiento de los efectos sobre los recursos pesqueros y marisqueros.
- vii. Efectos sobre el patrimonio arqueológico, en cuanto a que la actuación no provoca daños al patrimonio arqueológico no catalogado en el caso de zonas de vertido próximas a zonas de interés arqueológico.
- viii. Efectos sobre las infraestructuras y servicios próximos a la zona de vertido.

4. Se establecerán indicadores ambientales y se definirá un programa de muestreo y medición representativo para aquellos indicadores ambientales que requieran de una toma de muestras o de una medición en campo según lo indicado en el artículo 45.3.

5. Se identificarán escalas de valoración de los diferentes indicadores ambientales para realizar un seguimiento efectivo del grado de alteración del medio y estimar el grado de recuperación de la calidad del mismo según lo indicado en el artículo 45.4.

6. Se fijarán umbrales inadmisibles o condiciones límite que determinen la necesidad de adoptar medidas complementarias que eviten los efectos no deseados inducidos por la ejecución del vertido según lo indicado en el artículo 45.5.

7. Se definirán las medidas complementarias y/o correctoras a aplicar en el caso de que se superen los valores máximos establecidos como permisibles para los indicadores ambientales de control.

#### Artículo 47. ***Vigilancia de la colocación en recintos***

1. El programa de vigilancia ambiental para un recinto deberá diseñarse para determinar la efectividad del mismo en retener el material e impedir la liberación de contaminantes por diferentes rutas, asegurando el cumplimiento de las hipótesis de construcción y autorización con respecto al proyecto y evaluando los efectos sobre el medio ambiente con objeto de adoptar las medidas complementarias y/o correctoras oportunas, en caso de resultar necesarias.

2. El programa de vigilancia ambiental de un recinto constará de dos fases:

- i. Seguimiento durante el llenado del recinto. Se realizará un control de los elementos funcionales del recinto (aliviaderos, sistemas de drenaje y funcionamiento de las barreras impermeabilizantes) y de los elementos estructurales (diques, pendientes e integridad física de las barreras y revestimientos).

Como mínimo, se deberán tomar y analizar muestras del efluente y el medio acuático adyacente, con especial atención a los efectos sobre hábitats y especies. Para ello se deberá diseñar un programa de muestreo y medición representativo, tanto de la zona de actuación como de su área de influencia y de las zonas sensibles que pudieran existir en el entorno, con indicación de la frecuencia temporal con que se realizarán las medidas y la toma de muestras así como de los parámetros a determinar sobre cada una de las muestras.

- ii. Seguimiento del recinto a largo plazo. Una vez finalizada la colocación del material dragado, se continuarán los controles de los elementos funcionales y estructurales del recinto y de toma y análisis de muestras indicados para la fase de llenado. La intensidad y frecuencia de estos controles podrá ser inferior a la de la fase anterior y durante un periodo de tiempo que variará en función de los resultados obtenidos y que no finalizará hasta que se asegure la ausencia de efectos negativos sobre el medio ambiente.

#### Artículo 48. **Vigilancia del confinamiento subacuático**

1. El programa de vigilancia ambiental durante la fase de colocación de los materiales incluirá el mismo tipo de controles como si de un vertido al mar se tratara, contemplados en el artículo 46.

2. Adicionalmente se procederá a la inspección visual mediante filmación submarina del desarrollo de la operación, a fin de constatar que los materiales quedan dispuestos, de manera estable, sobre la zona prevista, procediéndose a la interrupción de las operaciones de colocación en caso contrario.

3. Una vez finalizada la colocación del material dragado y dispuesta la capa de material que los recubre, se controlará la estabilidad de la obra de confinamiento y la inmovilidad de los sedimentos confinados, así como la calidad ambiental del agua y de los fondos adyacentes. El programa de muestreo y medición incluirá, cuando resulte procedente en función del volumen de materiales colocado y la superficie utilizada, la realización de una batimetría y/o un reconocimiento mediante sonar de barrido lateral de los fondos de la zona para comprobar la inmovilidad de los sedimentos colocados. Estos controles deberán extenderse, al menos, hasta un año después de finalizada la operación de confinamiento.

#### Artículo 49. **Informes**

1. El programa de vigilancia ambiental describirá el tipo de informes técnicos de seguimiento a elaborar por el promotor así como su frecuencia. Las autoridades marítima y ambiental, en el ámbito de sus competencias, podrán recabar información de aquel al respecto, así como efectuar las comprobaciones necesarias para verificar el cumplimiento del condicionado incluido en la autorización.

2. Los informes, que deberán ser públicos, recogerán la valoración de los resultados de los diferentes aspectos ambientales incluidos en el programa respecto de los valores de referencia establecidos para determinar el estado ecológico o ambiental de la zona de actuación. En esta valoración se deberá determinar:

- i. La afección real al medio ambiente durante la realización de las obras y su evolución en el tiempo respecto del estado inicial.



- ii. El grado de desviación sobre las previsiones iniciales en la identificación y valoración de los impactos.
- iii. La eficacia de las medidas preventivas, correctoras y, en su caso, compensatorias implantadas y la necesidad de nuevas medidas.
- iv. La identificación de impactos no previstos o valorados de forma incorrecta en el proyecto, estudio de impacto ambiental o en el documento ambiental correspondiente y la necesidad de proponer medidas para su prevención y corrección.

3. El promotor informará a la autoridad marítima y a la autoridad ambiental competente de cualquier aspecto con incidencia sobre seguridad para la navegación o ambiental que pudieran sobrevenir durante el desarrollo de las actuaciones.

4. A la finalización de las actuaciones de dragado y reubicación de los materiales, se suministrará al órgano competente en materia de cartografía marina información sobre las modificaciones batimétricas significativas que hubieran podido producirse tras la ejecución del proyecto.

5. A la finalización de cada año natural incluido dentro del Programa de vigilancia ambiental, el promotor suministrará a la autoridad ambiental copia de los informes elaborados durante ese periodo.

#### **Artículo 50. *Plan de actuación ante situaciones de emergencia ambiental***

1. Se dispondrá de un plan en el que se identifiquen y evalúen las situaciones de emergencia ambiental y en el que se establezcan los mecanismos de alerta a las autoridades competentes y los mecanismos de coordinación con los planes de contingencia (territoriales, municipales, interiores y de autoprotección) en caso de emergencia ambiental.

2. Una vez solucionada la emergencia, el promotor remitirá a la autoridad competente un informe sobre la situación de emergencia ambiental acontecida y las medidas tomadas para su solución. Estos informes serán recogidos en el apartado de incidencias de los informes periódicos establecidos en el Artículo 49.



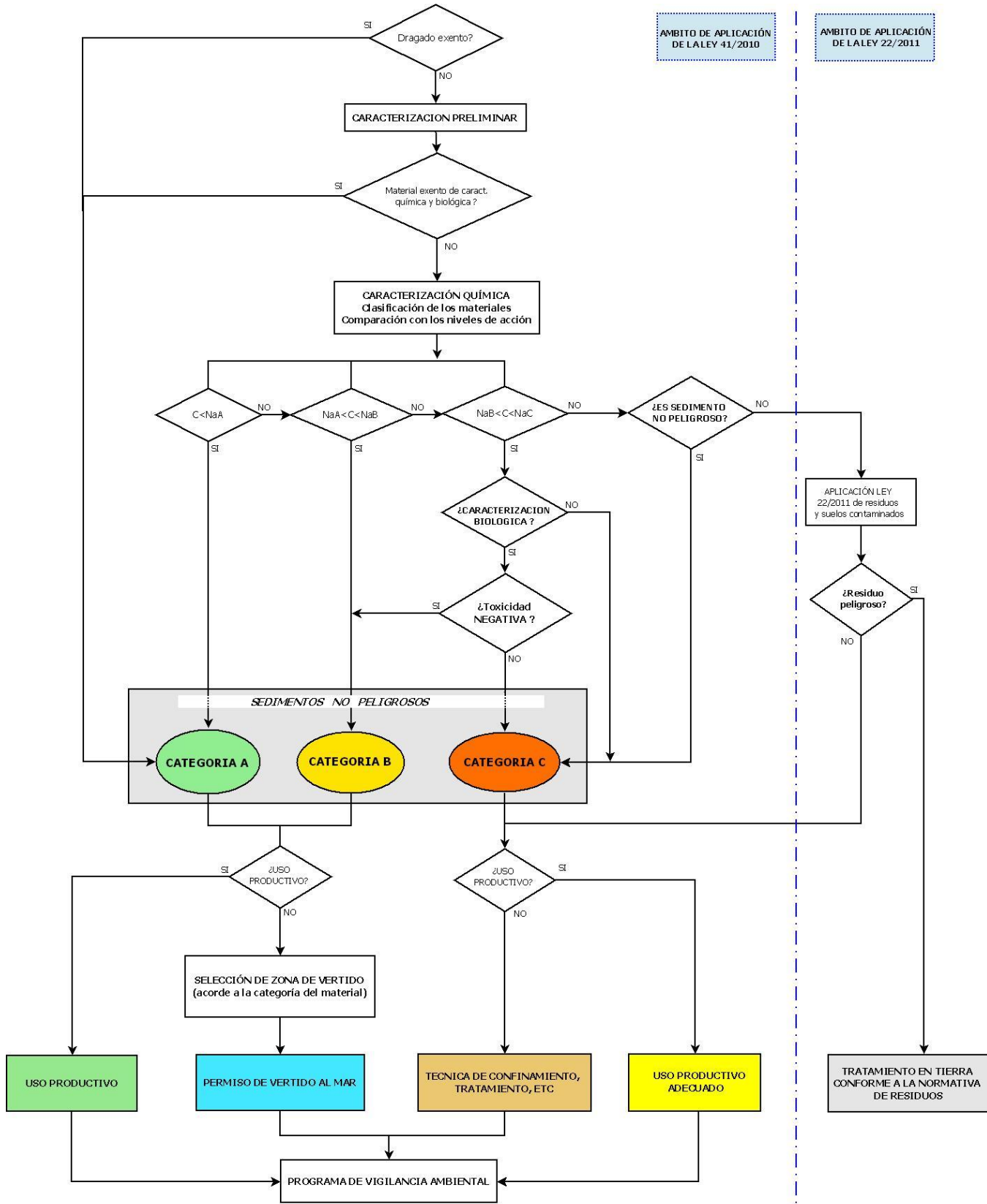
**DIRECTRICES PARA LA CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL DRAGADO Y SU  
REUBICACIÓN EN AGUAS DEL DOMINIO PÚBLICO MARÍTIMO-TERRESTRE**

---

**ANEJOS**



**ANEJO I: DIAGRAMA PARA LA CLASIFICACIÓN Y GESTIÓN DEL MATERIAL A DRAGAR**



## ANEJO II: TOMA DE MUESTRAS DE LOS MATERIALES A DRAGAR

### 1. TOMA DE MUESTRAS SUPERFICIALES Y PROFUNDAS

1. Las muestras superficiales deberán obtenerse mediante el empleo de muestreadores tipo cuchara específicamente diseñados para el muestreo de sedimentos. Podrá admitirse, cuando las circunstancias así lo aconsejen, el muestreo directo de los materiales mediante buceadores, utilizándose en tal caso el mismo recipiente que servirá para su almacenamiento, conservación y transporte.

2. Las muestras profundas serán obtenidas mediante el muestreador tipo corer de gravedad o mediante vibración (vibrocorer) adecuado en función del espesor de sedimentos a dragar en la zona, obteniéndose una columna de sedimentos que será segmentada en muestras individuales de 50 centímetros de longitud.

3. En aquellas estaciones donde se proceda a la toma de muestras profundas se tomará adicionalmente una muestra superficial, que será la representativa de la capa de los primeros 50 centímetros de espesor.

4. Las muestras profundas serán representativas de una capa de material de espesor equivalente a la diferencia entre la profundidad de adquisición de cada muestra individual y la profundidad de la siguiente submuestra analizada en el testigo.

5. Cuando habiéndose obtenido muestras profundas, la profundidad del dragado resulte superior a la columna de sedimentos recuperada, la submuestra más profunda de la columna se considerará representativa del resto del material subyacente, es decir, el espesor existente entre su profundidad y la profundidad de dragado proyectada en ese punto.

6. Previamente a la adquisición de cada muestra individual, el dispositivo de muestreo debe ser cuidadosamente limpiado y enjuagado repetidamente con agua de mar obtenida en la propia estación de muestreo donde se vaya a adquirir la muestra de material.

7. El muestreo directo de materiales de la cántara de dragado no podrá ser utilizado para la caracterización de los materiales.

### Cantidad de sedimento necesaria en cada muestra

8. La cantidad necesaria de sedimento para poder realizar los análisis y ensayos posteriores dependerá de la necesidad de realizar análisis químicos y bioensayos. En la siguiente tabla se especifica por parámetro la cantidad necesaria de sedimento que es necesario recoger por muestra.

<b>CANTIDAD MÍNIMA DE SEDIMENTO NECESARIA POR MUESTRA</b>			
<b>TIPO DE ANÁLISIS</b>		<b>VOLUMEN (mℓ)</b>	<b>MASA HÚMEDA (g)</b>
Análisis físicos	Granulometría	300	500
	Carbono orgánico total	20	35
Análisis químicos	Metales	60	100
	Contaminantes orgánicos	200	350
Análisis microbiológicos	Contaminantes fecales	100	175
Bioensayos	TPT	30	50
	Fecundación o embriogénesis en equinodermos	1.000	1.750
	Toxicidad en anfípodos	875	1.500
<b>TOTAL RECOMENDADO</b>		<b>2.600</b>	<b>4.500</b>

9. Dado que a priori resultará imposible conocer la necesidad de someter los materiales a determinaciones químicas y bioensayos, resulta recomendable la obtención en cada estación de muestreo de un volumen de muestra igual o superior al total, de manera que pueda evitarse el coste de tener que repetir el muestreo.

## **2. MANIPULACIÓN, CONSERVACIÓN, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE LAS MUESTRAS**

1. Inmediatamente tras la obtención de cada muestra, el material debe ser trasvasado al tipo de envase adecuado a la naturaleza de las determinaciones a realizar. En la medida de lo posible se evitará aquel material que hubiera podido estar en contacto con las paredes del dispositivo de muestreo, optándose por el material del centro de la muestra obtenida.

2. Todos los envases deben estar adecuadamente limpios y ser previamente enjuagados con agua de mar tomada en la propia estación de muestreo. Deberán además ser herméticos para evitar la evaporación de compuestos volátiles y fugas de gas y agua.

3. El material destinado a determinación de metales, metaloides o materia orgánica se dispondrá en bolsas o tarros de boca ancha de plástico de alta densidad, refrigerándose a 4°C lo antes posible, modo en el cual podrán conservarse durante varias semanas. Para periodos mayores de almacenamiento las muestras deberán ser congeladas por debajo de -20°C. La porción destinada al análisis de mercurio se almacenará preferiblemente en recipientes de vidrio cuando la determinación se realice en un plazo superior a las 48 horas.

4. Para la determinación de compuestos orgánicos se evitarán los recipientes de plástico (excepto PTFE) ya que podría producirse adsorción de estos compuestos en el material del recipiente.

5. El material destinado a determinaciones microbiológicas deberá disponerse en envases preferiblemente de polietileno de alta densidad previamente esterilizados en autoclave y refrigerarse inmediatamente a 4°C, sin que en ningún caso deban ser congeladas las muestras. Los análisis deberán iniciarse dentro de las 24 horas siguientes al muestreo.

6. Para la determinación del TPT las muestras se conservarán refrigeradas a 4°C. Los análisis deberán realizarse lo antes posible y en cualquier caso dentro de los 7 días siguientes al muestreo.

7. Las muestras se transportarán a la mayor brevedad en recipientes cerrados llenos, evitando en la medida de lo posible que quede aire en su interior, no excediendo la temperatura de 25°C. Si las muestras no se van a analizar en el transcurso de 48 horas tras



el muestreo, se procederá a su almacenamiento a 4°C para conservación a corto plazo, o a su congelación (inferior a -20°C) para períodos superiores a un mes. En el caso de los HAPs y butilestaños hay que tener en cuenta que se trata de compuestos fotodegradables, por lo que los envases deberán estar protegidos de la luz en todo momento, siendo altamente recomendable la utilización de recipientes de vidrio ámbar.

8. El material destinado a bioensayos se dispondrá en recipientes de plástico de alta densidad. Estas muestras no podrán ser, en ningún caso, congeladas y se mantendrán en los recipientes herméticamente cerrados en ambiente refrigerado hasta el inicio de la realización de los ensayos en un plazo máximo de 3 semanas recomendándose su comienzo en la primera semana.

9. Cada muestra, una vez trasvasada al envase correspondiente, debe ser identificada mediante la anotación sobre el propio envase con tinta indeleble o mediante etiqueta, de la estación de muestreo y profundidad a la que corresponde, así como su fecha de adquisición.

10. En caso de tratarse de muestras obtenidas mediante corer, los mismos serán fraccionados en porciones de 50 centímetros preferentemente a bordo de la embarcación. Cada fragmento será trasvasado a los correspondientes envases adecuados a la mayor brevedad posible o se procederá al cerrado y sellado adecuado de cada fragmento.

11. Una vez lleguen las muestras individuales al laboratorio y previa composición de muestras si se opta por la misma, se realizará lo antes posible el tamizado por tamiz de 2 mm para obtener así la fracción objeto de análisis y eliminar la presencia de detritos y posibles organismos bentónicos presentes.

### **Manipulación de las muestras durante la campaña de muestreo**

12. Durante las distintas operaciones del muestreo deben tomarse una serie de precauciones en la manipulación de las muestras para evitar cualquier alteración que pudiera afectar a la calidad de los resultados o a la seguridad del personal que lo realiza:

13. Deben utilizarse sistemas de protección individual adecuados que prevengan tanto la contaminación de las muestras como la exposición del personal, evitando contactos dérmicos e inhalaciones en la medida de lo posible. Hay que tener en cuenta que los

sedimentos pudieran contener mezcla de multitud de sustancias, incluso bacterias y virus, potencialmente peligrosos.

14. Las muestras deben ser manipuladas en espacios bien ventilados. Las superficies de trabajo deben ser de materiales fáciles de limpiar, poco porosos, para evitar la absorción de contaminantes.

15. Los procesos de manipulación deberían minimizarse y llevarse a cabo lo antes posible tras la toma, para evitar cambios de temperatura y exposiciones al aire que pudieran afectar a las condiciones geoquímicas y bioquímicas de las muestras de sedimento.

16. Una vez en cubierta, las muestras deben ser protegidas de las posibles fuentes de contaminación del entorno: humos de escape de los motores y grasa de la embarcación, radiación solar, salpicaduras, etc.

17. Los recipientes de muestreo, preferiblemente preetiquetados, deben llenarse en su totalidad para evitar la disponibilidad de oxígeno en su interior.,

18. En caso de obtención de testigos tipo corer, si no es posible su fragmentación antes de su transporte al laboratorio, debe identificarse inmediatamente tras su extracción, marcando claramente la orientación (extremo superficial y profundo), manteniéndolo siempre vertical. La parte del tubo que pudiera haber quedado vacía debe ser eliminada, para evitar desplazamientos y mezcla de la muestra, así como oxidaciones indeseables, sellando los tubos con tapas herméticas de materiales adecuados. En cualquier caso, deben recogerse los datos de penetración real de los testigos e incidencias del muestreo para posibilitar la buena interpretación de los resultados.

19. Debe cuidarse la limpieza de los equipos entre los muestreos a fin de evitar contaminaciones cruzadas entre distintos puntos, utilizando primero agua de la estación previamente muestreada y posteriormente con agua del punto en el que se vaya a realizar la siguiente toma.

## **Etiquetado e identificación de las muestras**

20. Los recipientes de muestreo estarán preferiblemente preetiquetados antes del comienzo del muestreo, de acuerdo con un código de nomenclatura preestablecido que resulte claro y conciso, que incluirá aparte de los códigos específicos de la muestra, algún tipo de clave identificativa del estudio, así como la fecha de muestreo.

21. Se utilizará, a tal fin, un etiquetado resistente al agua y rotulado siempre con tintas indelebles. Un sistema con buenos resultados, especialmente útil para muestras en bolsas, es la identificación mediante el empleo de etiquetas de lámina de plástico semirrígido, atadas a la bolsa mediante alambre fino, flexible y plastificado, además de la rotulación directa en la bolsa o recipiente en cuestión.

22. Resulta recomendable la elaboración de un informe del muestreo que recoja todos aquellos datos e incidencias producidas durante el desarrollo de las operaciones, que ayudarán a la posterior interpretación de resultados, especialmente en casos anómalos con respecto a lo esperable. Se completará un estadillo por cada muestra que incluirá información sobre:

- Referencia de la muestra. Hora y fecha;
- Tipo de muestra y equipo de muestreo empleado;
- Posición y Profundidad;
- Condiciones durante la toma (meteorología, oleaje, tráfico, etc.);
- Personal que realiza el muestreo;
- Desviaciones con respecto al programa previsto;
- Descripción de la muestra tras su extracción: textura, color, olor, presencia de biota, cantidad de sedimento recuperada;
- En el caso de testigos en profundidad: longitud de muestra tras la extracción y penetración real del testigo;
- Fotografías ilustrativas del entorno y de las muestras;
- Otras observaciones.

## **ANEJO III: CARACTERIZACIÓN BIONÓMICA**

### **1. OBJETIVOS Y GENERALIDADES**

1. El estudio de caracterización bionómica debe permitir conocer la presencia o ausencia de comunidades y especies ecológicamente sensibles que pudieran verse significativamente afectadas, al objeto de descartar o confirmar la idoneidad de la zona propuesta para el vertido (artículo 29.5.v), así como servir para establecer el nivel de base o estado cero en los programas de vigilancia ambiental (artículo 46.3).

2. Si bien la metodología propuesta se refiere fundamentalmente a la caracterización de la zona de vertido del material dragado, no debe descartarse su aplicación incluso al estudio de la zona de dragado si ésta tiene especiales valores naturales, aunque sea dentro de un ambiente portuario.

3. La caracterización bionómica deberá contemplar tanto la zona de actuación como su área adyacente para evaluar un posible efecto indirecto a largo plazo del material vertido en hábitats sensibles a la turbidez y deposición de material.

4. Se propone un guión metodológico acerca de cómo debe realizarse dicha caracterización, sin entrar en el detalle de las distintas metodologías (por ejemplo de las técnicas de muestreo o de la operatividad de un determinado instrumento muestreador), que ya están muy desarrolladas en diversas fuentes bibliográficas.

5. El estudio de caracterización bionómica se adaptará a la profundidad de la zona y sus características potenciales, y deberá proporcionar la información correspondiente a dos aspectos:

- Caracterización morfológica superficial y clasificación de los fondos.
- Caracterización de las comunidades biológicas y sedimentaria.

6. No se incluye en este anejo la metodología para la realización de un estudio hidrodinámico y de dispersión<sup>1</sup>, si bien, tal como se establece en el artículo 29.4 de las presentes Directrices puede resultar preceptivo en determinadas ocasiones y sus resultados serán la base del ámbito geográfico al que se debe circunscribir la caracterización bionómica. De igual modo, la adquisición de datos sobre otros parámetros físico-químicos y biológicos como son la irradiancia submarina, concentraciones de nutrientes en la columna de agua, niveles de clorofila, materia orgánica del sedimento y potencial red-ox contribuirán a interpretar adecuadamente la información.

7. La primera fase del estudio consistirá en la revisión de toda la información documental disponible sobre los aspectos mencionados, con el principal objetivo de conocer sus antecedentes y prever la presencia potencial de hábitats o especies relevantes por su alto valor ecológico – por ejemplo, praderas de fanerógamas, coralígeno, fondos detríticos costeros (maërl), hábitats con macroalgas, laminariales, etc. - , por albergar hábitats o especies protegidas por la legislación nacional, autonómica o internacional (como la Directiva Hábitats o las listas de hábitats y especies protegidas por los Convenios Regionales de Protección del Medio Marino), especies invasoras o de interés pesquero-marisquero. En dicha revisión se deberá recoger también la identificación de caladeros de interés pesquero-marisquero.

Si tras este estudio bibliográfico no se pudiera disponer de la información adecuada o no se pudieran descartar factores ecológicos limitantes (que implicaran la consideración de la zona de vertido y/o zonas adyacentes como una zona ecológicamente sensible y por lo tanto descartable como emplazamiento para el vertido), se procederá a la realización de los trabajos de campo y evaluación de sus resultados, de acuerdo con la metodología que se presenta a continuación.

## **2. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA SUPERFICIAL Y CLASIFICACIÓN DE FONDOS**

1. Es muy importante definir adecuadamente el área de estudio morfológico superficial, en definitiva, el área de estudio a caracterizar bionómicamente. Así, la escala de la cartografía

---

<sup>1</sup> Es importante la realización de estudios de hidrodinamismo y de transporte y resuspensión de sedimentos (antes, durante y después del dragado/vertido), para conocer los posibles efectos en la zona de dragado/vertido y sus zonas adyacentes, las cuales pueden tener hábitats sensibles a la perturbación del sedimento, a descensos de la transparencia de la columna de agua (ej. fanerógamas marinas, laminariales, agregaciones de corales con zooxantelas tipo *Cladocora caespitosa*, etc..) o al aumento de tasas de sedimentación (e.j. coralígeno, maërl, etc.).

bionómica resultante deberá estar de acuerdo con las características de la actuación y con las de los procesos de transporte que pueden influir sobre la actuación de vertido y reubicación del material.

2. Como primera acción se deberá realizar un levantamiento morfológico de la superficie del fondo marino, siendo las técnicas más adecuadas para ello la ecosonda multihaz y el sonar de barrido lateral (SBL) o, alternativamente a las anteriores, la utilización de sondas interferométricas cuando la profundidad de trabajo lo permita.

El orden lógico de actuación sería el siguiente:

- i. Toma de datos batimétricos mediante ecosonda multihaz y procesado de los mismos;
- ii. Adquisición de un mosaico de SBL;
- iii. Incorporación de los datos biológicos.

Dentro del anterior esquema de actuación, la aplicación de programas de cartografía predictiva de hábitats puede facilitar el esfuerzo de muestreo o reconocimiento biológico.

A continuación se desarrollan algunos de estos puntos:

**Toma de datos batimétricos:**

3. Mediante sistema de ecosonda multihaz con cobertura al 100% del fondo marino y con “overlap” entre barridos de un 33%, en todo caso cumpliendo o excediendo las normas del OHI para levantamientos con multihaz. La elección de los sistemas más idóneos dependerá de la profundidad de la zona a trabajar aunque existen sistemas comerciales de alta resolución que cubre el rango de profundidad de -5 a -150 m de profundidad y serían los más adecuados para este trabajo.

4. Simultáneamente al reconocimiento mediante Ecosonda multihaz se recomienda realizar una malla de perfiles sísmicos de alta a muy alta resolución utilizando sistemas tipo

penetrador de fangos 3,5 kHz, o los nuevos sistemas sísmicos basados en efecto paramétrico.

5. En todos los casos, los equipos deberán estar sincronizados con un GPS (diferencial o RTK) para el correcto posicionamiento de las medidas. Los transectos deben tener cierto grado de solapamiento (un 20% aproximadamente) para asegurar información del 100% de la zona prospectada. La embarcación debe navegar a una velocidad adecuada para registrar una densidad de datos suficientemente elevada como para producir un modelo digital de elevaciones de suficiente resolución, que permita identificar las diferentes morfologías del lecho marino.

6. Los registros obtenidos serán procesados para eliminar datos erróneos y aplicar la corrección de marea. Posteriormente se recomienda generar un modelo digital de elevaciones con la máxima resolución que permitan la densidad de datos. Por otro lado, se generará también una imagen con los datos de reflectividad adecuadamente filtrados y corregidos.

7. El procesado e interpretación de los datos anteriores, comprendería:

- Realización de mapa batimétrico;
- Procesado de la reflectividad acústica de la ecosonda multihaz o interferométrica (backscatter);
- Interpretación, en su caso, de líneas sísmicas;
- Elaboración de mapas de características texturales superficiales.

8. La elaboración de un modelo digital del terreno (MDT) resulta recomendable para una mejor interpretación de los resultados.

#### **Adquisición de mosaico de SBL:**

9. En caso de usar SBL se recomienda un equipo con una frecuencia mínima de trabajo de 350 kHz y un rango lateral de 150 m por cada banda del “pez”. La altura del “pez” sobre el fondo debe ser de aproximadamente 15 m (10% del rango de barrido), siguiendo líneas de

navegación espaciadas lo necesario para que la zona isonificada entre líneas adyacentes tenga un solape mínimo entre ellas del 20%. La adquisición de los datos se deberá realizar a la velocidad que el sistema y estado de la mar permitan para una calidad óptima de cobertura del fondo marino.

10. En caso de zonas con profundidades superiores a los 50 metros se deberá usar un depresor, al objeto de garantizar el mantenimiento de la correcta altura sobre el fondo y preferiblemente un winch eléctrico, con control de cable por parte del operador de SBL.

11. La interpretación de los datos se debería realizar teniendo en cuenta la morfología previa (Ecosondas), el tipo de suelo y subsuelo (sistemas sísmicos) y a ser posible con datos directos (muestras y transectos video-foto). Un software adecuado permitirá finalmente integrar toda esa información, de modo que se realice un mosaico del fondo marino, interpretándose e identificándose las zonas que ofrezcan la misma impedancia acústica: rocas, cobertura vegetal, restos y elementos sumergidos en el fondo, etc.

12. La interpretación conjunta de los datos de distribución de profundidades y reflectividad debe permitir discriminar y clasificar el fondo marino en función de sus características morfológicas y de la distribución espacial de diferentes tipos sedimentarios.

13. A la vista de la interpretación de los datos obtenidos se planeará la siguiente fase del levantamiento, que consistirá en una inspección visual del fondo marino.

#### **Incorporación de los datos biológicos:**

14. Se realizará a través de filmaciones submarinas, mediante ROV (vehículos operados remotamente), con buceadores (en caso de que la profundidad lo permita) y/o con vídeo remolcado georeferenciado, realizándose un número de transectos tal que permita reconocer las distintas unidades morfológicas detectadas. En zonas más profundas se podrán sustituir por filmaciones georeferenciadas puntuales, en un número de puntos suficiente para representar las distintas unidades detectadas y, especialmente, las anomalías y elementos diferenciados, así como las zonas donde se encuentren los límites de cada unidad morfológica.



15. Tras esta fase se obtendrá un mapa morfológico definitivo, del que se derivará, mediante interpretación por especialista, una cartografía bionómica asociada. Previamente sería de gran utilidad la aplicación de programas de predicción de hábitats tipo BTM, ENFA, etc.

### **3. CARACTERIZACIÓN DE LAS COMUNIDADES BIOLÓGICAS Y SEDIMENTARIA**

1. El número de estaciones de muestreo dependerá del área a muestrear, el hábitat o especie y los descriptores a emplear. Dicho número habrá de ser estadísticamente representativo para caracterizar la comunidad y sus variaciones en el espacio y en el tiempo y deberá ser suficiente como para representar todas las unidades bionómicas identificadas a partir de los trabajos descritos en el apartado anterior.

2. Por su sencillez en este tipo de estudios se suele realizar siempre una toma de muestras mediante una draga adecuada a la profundidad y al tipo de fondo (Van Veen, box corer, Smith-McIntyre o similares), si bien se recomienda que puedan ser complementadas con otro tipo de muestreos lineales (draga de arrastre, tipo Foster, etc).

3. El sedimento extraído se lavará abundantemente con agua marina a través de una malla de 1 mm de luz con la finalidad de eliminar el material de tamaño inferior. Esta operación se realizará de forma inmediata, preferiblemente a bordo de la embarcación, al objeto de evitar el deterioro de los ejemplares con tejidos blandos.

4. Posteriormente, para la preservación del material biológico las muestras se fijarán con formol neutralizado en agua marina al 4%. Ya en el laboratorio, se procederá a la identificación taxonómica y recuento del número de individuos de cada taxón; se intentará, en la medida de lo posible, llegar al nivel de especie, para lo que se debe contar con expertos taxónomos. En cada una de las muestras se determinarán los parámetros habituales para la caracterización de las comunidades bentónicas con el objeto de determinar la existencia de comunidades ecológicamente sensibles que pudieran verse significativamente afectadas, Entre tales parámetros cabe incluir:

- Abundancia taxonómica: número de individuos por taxón;
- Dominancia (%): número de individuos del taxón i/número total de individuos de la muestra;

- Diversidad taxonómica: expresada según la fórmula de Shannon, con logaritmo en base 2 (Shannon y Weaver, 1963);
- Riqueza taxonómica: expresada como número de taxones;
- Densidad de organismos: número de individuos por m<sup>2</sup>;
- Equitatividad: nivel de estructuración de la muestra, según el índice de Pielou (Pielou, 1959);
- Distribución porcentual de los principales grupos de macrobentos;
- Se debe de acompañar todo lo anterior de un listado faunístico/florístico del total de muestras estudiadas.

5. Adicionalmente, resulta recomendable la utilización de índices bióticos marinos -como por ejemplo el AMBI<sup>2</sup>, desarrollado en España- para evaluar la calidad ambiental del medio marino. Podrán utilizarse los métodos y criterios aprobados oficialmente en España para el cumplimiento de la Directiva Marco del Agua.

6. Además de la toma de muestras y análisis para la caracterización bionómica, y adicionalmente a la caracterización sedimentológica establecida en el artículo 29.5 de las presentes Directrices, en cada estación se tomará una réplica adicional para la caracterización sedimentaria; en dichas muestras se determinará el contenido en materia orgánica, la distribución granulométrica y el potencial redox (preferiblemente medido a bordo, inmediatamente después a la recogida de las muestras mediante draga).

---

<sup>2</sup> AZTI marine biotic index: <http://ambi.azti.es>

## **ANEJO IV: METODOLOGÍA ANALÍTICA**

Con el fin de conseguir una eficiente estandarización de los resultados analíticos, se presentan las pautas metodológicas básicas que deben seguirse en la caracterización de los materiales a dragar a efectos de aplicación de las presentes Directrices.

### **1. PROGRAMA DE ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LAS MEDIDAS**

Los laboratorios encargados de la realización de los análisis deberán tener implementados programas de aseguramiento y control de la calidad de los mismos, que deben contemplar al menos los siguientes aspectos:

- Procedimientos operativos estándar para todos los trabajos realizados en el proceso, consistentes en una descripción detallada, específica del laboratorio, de todas las acciones adoptadas para llevar a cabo las mediciones.
- Documentación que acredite que todos los procedimientos de manipulación de muestras y análisis se siguieron correctamente.
- Protocolos de control de calidad, que incluirán el análisis de materiales de referencia y controles de blancos con cada lote analítico de muestras. Estos materiales de referencia serán muestras de referencia del laboratorio y Materiales de Referencia Certificados de producción independiente, que contengan las certificaciones de los parámetros implicados, basadas en métodos analíticos similares a los empleados en el análisis de las muestras, siempre que exista disponibilidad comercial.
- Realización de gráficos o registros de control de calidad, que permitan evaluar el rendimiento diario. Si los resultados obtenidos para el material de referencia de cualquier lote de muestras excedieran los límites de aceptación establecidos, el lote deberá ser rechazado y volver a ser analizado.
- Participación en programas de intercalibración de laboratorios organizados por organismos reconocidos, que incluyan programas sobre los parámetros y matrices incluidos en las presentes Directrices.
- Cadena de custodia de la documentación para asegurar la correcta correspondencia entre los datos analíticos, muestra en proceso y su ubicación geográfica.

Los aspectos anteriormente detallados deberán ser específicamente documentados en el informe de resultados analíticos, junto con la descripción detallada de los protocolos

analíticos empleados en el análisis de las muestras y los límites de cuantificación utilizados que deberán ser, en todo caso, iguales o inferiores a los establecidos en el artículo 18.

## **2. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS**

Para las determinaciones analíticas posteriores, las muestras deberán someterse a las siguientes etapas preparativas que serán realizadas de manera sucesiva:

### **2.1. Homogeneización inicial**

Se realizará sobre la muestra húmeda de forma que no se pongan en contacto con la muestra elementos y materiales susceptibles de aportar elementos contaminantes.

### **2.2. Separación de la fracción inferior a 2 mm**

La caracterización preliminar (excepto análisis granulométrico) y caracterización química del material a dragar se realizará sobre la fracción no gruesa, es decir, sobre la fracción menor de 2 mm, retirando la fracción superior a este tamaño mediante tamizado manual o mecánico, utilizando un tamiz de 2 mm de luz de malla construido con materiales libres de aportes contaminantes que pudieran interferir en las determinaciones posteriores. Teniendo en cuenta las determinaciones de metales pesados, resultan adecuados los tamices con malla y bastidor de nailon.

El tamizado deberá realizarse con la muestra en su estado de humedad natural y, si fuera preciso, con la ayuda de una espátula de material adecuado (por ejemplo, teflón). En los casos en que la muestra no quede compactada tras el secado, el tamizado podrá ser posterior a la etapa de secado adecuada para cada parámetro.

Los tamizados en húmedo, con aporte adicional de cantidades limitadas de agua para facilitar el paso a través del tamiz, deberán aplicarse solo en casos de extrema dificultad en el proceso de tamizado, debido a los no deseables cambios fisicoquímicos que pueden inducir en la muestra.

## **2.3 Fraccionamiento y triturado**

Se realizará el fraccionamiento de la muestra para los distintos fines analíticos de acuerdo con los tradicionales métodos de cuarteo que aseguren la representatividad de la fracción. Con posterioridad, cada una de estas submuestras será sometida a un proceso de secado específico y apropiado a las determinaciones que sobre ella deban realizarse. Cada una de las submuestras, salvo la destinada a análisis granulométrico, será sometida a un proceso de molturación, que mediante una adecuada reducción del tamaño de partícula, asegurará la homogeneidad de la alícuota analítica, facilitando al mismo tiempo tratamientos previos posteriores, como extracciones o digestiones.

El proceso de triturado deberá realizarse con instrumental adecuado, libre de aportes contaminantes y que garantice la eficiencia y reproducibilidad del proceso. Para tal fin son recomendables los molinos planetarios de bolas, de materiales resistentes a la abrasión, como ágata, nitruro de sílice o cualquier otro libre de interferencias con los parámetros de análisis.

## **3. ANÁLISIS FÍSICOS**

### **3.1. Análisis granulométrico**

Se realizará sobre la muestra total previamente homogeneizada y tomando como referencia general las pautas establecidas en la norma UNE 103101:1995 “Análisis granulométrico de suelos por tamizado”. El informe de este ensayo granulométrico recogerá, al menos, los siguientes aspectos:

- Porcentaje de gruesos ( $P_G$ );
- Porcentaje de finos ( $P_F$ );
- Porcentaje de arenas ( $P_A$ );
- Curva de distribución granulométrica, según diseño descrito en la mencionada norma, basada en una serie no inferior a 11 tamices, comprendidos entre 2 mm y 0,063 mm, ambos inclusive, con tamaños intermedios distribuidos de modo regular

en este intervalo, según serie de tamices UNE 7050-3:1997<sup>1</sup> o equivalente y luces de malla: 2 mm, 1,4 mm, 1 mm, 0,710 mm, 0,600 mm, 0,500 mm, 0,355 mm, 0,250 mm, 0,180 mm, 0,125 mm y 0,063 mm;

- Cálculo del  $D_{50}$ , entendido como el tamaño de luz de malla que dejaría pasar el 50% del material.

### 3.2. Concentración de sólidos

La concentración de sólidos, es decir, la masa de sólidos por unidad de volumen de sedimento "in situ", se calculará mediante la expresión:

$$C_S = \frac{1,5 P_F + 1,7 P_A + 1,8 P_G}{100}$$

donde :

$P_G$  = Porcentaje de gruesos.

$P_A$  = Porcentaje de arenas.

$P_F$  = Porcentaje de finos.

Y debiendo cumplirse la relación:  $P_G + P_A + P_F = 100$

---

<sup>1</sup> UNE 7050-3:1997 Tamices y tamizado de ensayo. Parte 3: Exigencias técnicas y verificaciones de los tamices de ensayo de tela metálica.

## **4. ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS**

### **4.1.- Preparación de muestras**

Para los análisis microbiológicos del sedimento resulta imprescindible la preparación de una suspensión inicial en un medio adecuado en el que se facilite la liberación de los microorganismos y a partir de la cual se puedan preparar las diluciones sucesivas necesarias en cada caso. Estas suspensiones se prepararán tomando como referencia lo descrito a este fin en el método UNEP/WHO "Determination of faecal coliforms in sediments by the pour plate (PP) method", según se describe a continuación.

Se pesarán 10 g de sedimento (fracción inferior a 2 mm), con su humedad natural, en matraz Erlenmeyer u otro recipiente adecuado, previamente esterilizado. A continuación se añadirán 89,5 ml de un tampón de fosfato (descrito a continuación) y 0,5 ml de Tween 80 que facilita la liberación de las bacterias asociadas a partículas del sedimento. Esta suspensión se mantendrá en una placa de agitación durante 30 minutos, tras los cuales se dejará en reposo durante otros 15 minutos. Finalizado el tiempo de reposo se procederá a la preparación de las diluciones adicionales necesarias, con el mismo tampón, o bien a la siembra o filtración directa, según las necesidades derivadas de las concentraciones esperadas y técnica de cultivo utilizada para la determinación de los parámetros indicadores de contaminación fecal que correspondan en función de la normativa estatal o autonómica que resulte de aplicación. (Art. 15.3)

Los resultados se expresarán en unidades formadoras de colonias (UFC) o microorganismos por gramo de sedimento (húmedo) teniendo en cuenta la cantidad de sedimento de partida en la solución madre (10 g/100ml)

Tampón de fosfato (pH=7,2)

$K_2HPO_4$ .....3,0 g

$KH_2PO_4$ .....1,0 g

Agua destilada c.s.p.....1000 ml

Esterilización en autoclave (121°C durante 15 min)

## **5. ANÁLISIS QUÍMICOS**

## 5.1. Carbono orgánico total

La determinación del Carbono orgánico total se realizará sobre la fracción de la muestra inferior a 2 mm, existiendo multitud de alternativas metodológicas, cada una de las cuales con sus ventajas e inconvenientes en cuanto a eficiencia, reproducibilidad, sencillez, coste económico, etc. Con el fin de disponer de una base analítica que garantice resultados suficientemente reproducibles y comparables a los fines de las presentes Directrices, se han seleccionado las siguientes alternativas metodológicas que, con los matices que se indican, cubren las expectativas necesarias y posibilitan la realización de la determinación a un amplio número de laboratorios aun no disponiendo de sofisticados sistemas automatizados:

- I. **Métodos automatizados basados en combustión seca** a alta temperatura en atmósfera de oxígeno puro y medida del CO<sub>2</sub> desprendido mediante detector de IR o de conductividad térmica:

Estos métodos requieren la eliminación previa del carbono inorgánico (carbonatos) mediante ataque ácido, generalmente con HCl, que debe ser cuidadosamente optimizada y controlada, requiriéndose un secado posterior de la muestra (105°C). Estos sistemas requieren de trampas y filtros que garanticen la retención de partículas, halógenos procedentes del contenido en sal de las muestras y del tratamiento previo y vapor de agua, para evitar interferencias no deseadas en la medida, resultando fundamental su mantenimiento y control para garantizar su eficiencia.

Alternativamente se puede calcular el carbono orgánico por diferencia entre las determinaciones individuales de carbono total y carbono inorgánico.

- II. **Métodos basados en la oxidación química:**

El carbono orgánico total presente en las muestras se evalúa mediante la medida del Carbono orgánico oxidable (COOx) con dicromato potásico en presencia de sulfúrico, valorando el exceso de oxidante con sulfato ferroso amónico (sal de Mohr), calculando así la cantidad de carbono orgánico oxidado a partir de la cantidad de dicromato reducido.

Se recomienda la aplicación del siguiente protocolo derivado del clásico método de *Walkley-*



*Black (1934)* y las modificaciones propuestas por *Mebius (1960)*:

### Reactivos

- (a) Dicromato potásico 1 N. Disolver 49,05 g de dicromato potásico en agua y diluir hasta un litro.
- (b) Ácido sulfúrico concentrado conteniendo 25 g de  $\text{SO}_4\text{Ag}_2$  por litro.
- (c) Ácido fosfórico concentrado.
- (d) Difenilamina en solución sulfúrica. Disolver 0,5 g de difenilamina en 20 ml de agua y añadir 100 ml de ácido sulfúrico concentrado. Si se dispone de potenciógrafo automático no se precisa el indicador citado anteriormente.
- (e) Sulfato ferroso amónico (Sal de Mohr) 0,5 N. Disolver 196,1 g de  $(\text{SO}_4)_2\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  en 800 ml de agua que contenga 20 ml de ácido sulfúrico concentrado, diluyendo hasta 1 litro. Normalizar esta solución cada vez que se emplee, valorándola con 10 ml de solución 1N de dicromato potásico.

### Procedimiento

Pesar una muestra de sedimento triturado, del orden de 0,5 g. (de 0,05 g para materiales con elevado contenido de materia orgánica a 2 g para materiales arenosos limpios) y colocarla en un matraz Erlenmeyer de 500 ml. Añadir, mediante bureta, 10 ml de reactivo (a) imprimiendo un movimiento de giro al matraz para asegurar una mezcla íntima con el sedimento. Añadir, lentamente y agitando, 20 ml de reactivo (b) y mantener en ebullición controlada a 150°C (no superar esta temperatura) durante 30 minutos. Añadir 200 ml de agua, dejar enfriar y agregar, a continuación, 10 ml del reactivo (c) introduciendo también en el matraz una barra agitadora con recubrimiento de teflón.

Valorar preferiblemente mediante un potenciógrafo automático con (e) en escala de milivoltios y utilizando electrodo de placa de platino frente a electrodo de referencia de sulfato de mercurio. Si no se dispone de potenciógrafo automático, añadir 4 ó 5 gotas del indicador (d) y valorar con la sal de Mohr (e) mediante bureta y utilizando agitador magnético hasta cambio de color. La coloración vira de rojo burdeos a verde brillante pasando por tonos azul violáceo.

Si se observa una reducción superior al 80 por 100 del dicromato, la determinación deberá repetirse con una menor cantidad de sedimento.

### Cálculos

El Carbono orgánico oxidable, expresado en porcentaje de sedimento seco a 105° C, se calcula mediante la fórmula:

$$COO_x (\%) = \frac{0,003 \cdot 100 (M - M')}{P}$$

donde:

M = miliequivalentes de dicromato potásico añadidos.

M' = miliequivalentes de sulfato ferroso amónico consumidos.

P = peso, en gramos, de la muestra referido a peso seco a 105° C.

### **5.2.- Metales y metaloides**

Se determinarán los siguientes metales pesados: Hg, Cd, Pb, Cu, Zn, Ni y Cr y el arsénico (As). Los resultados se expresarán en mg/Kg sobre materia seca.

#### Preparación adicional de la muestra

Las muestras destinadas al análisis de metales deberán secarse en estufa a 55°C. La fracción inferior a 2 mm se someterá a un proceso de trituración hasta obtención de un tamaño máximo de partícula no superior a 20 micras, con el fin de asegurar una correcta homogeneidad y facilitar el posterior proceso de digestión.

### Digestión ácida la muestra

Se aplicará un protocolo de digestión de las muestras basado en el tratamiento exclusivo con ácido nítrico concentrado, complementado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en aquellos casos en los que una elevada presencia de materia orgánica lo aconseje, para facilitar así la oxidación de la misma. Este tratamiento se realizará siempre cerrado, bajo presión, en recipientes diseñados a tal fin, siendo recomendables los sistemas basados en tratamiento con microondas. Este procedimiento no será aplicable para la determinación analítica de Cr(VI).

La cantidad de muestra a digerir y el volumen de ácido empleado variarán en función de las características del sistema, siendo recomendable en los de microondas, trabajar con entre 0,5 y 1 g de muestra y un volumen de ácido concentrado entre 2,5 y 5 ml, enrasando finalmente con agua de calidad reactivo a 50 ó 100 ml.

Las condiciones de tiempo, temperatura y presión deberán optimizarse en cada caso, de acuerdo con las características del sistema empleado, para asegurar una buena eficiencia del proceso y reproducibilidad de los resultados. Como referencia, se presenta el siguiente programa de digestión estándar en horno microondas:

- Etapa 1: 60 psi durante 2 minutos.
- Etapa 2: 120 psi durante 30 minutos.
- Etapa 3: enfriamiento hasta temperatura ambiente.

### Medida de los metales

Se recomienda la técnica de espectrometría de absorción atómica, en combinación con los distintos sistemas de atomización: llama, cámara de grafito, generación de hidruros para el arsénico y técnica de vapor frío para el caso específico del mercurio. No obstante, será válida cualquier otra técnica de medida tales como ICP en sus distintas versiones y analizadores específicos de mercurio, siempre y cuando se demuestre la correcta validación metodológica para el control de interferencias y el alcance de los límites de cuantificación mínimos exigidos.

### **5.3.- Policlorobifenilos (PCBs)**

Se determinarán<sup>2</sup> los siguientes 7 congéneres: 28, 52, 101, 118, 138, 153 y 180. Los resultados se expresarán en mg/Kg sobre materia seca.

### Pretratamientos

La extracción de los PCBs podrá realizarse sobre muestra seca o húmeda, aunque la conservación, homogeneización y extracción se simplifican trabajando en seco. Entre las diversas alternativas de secado se pueden contemplar las siguientes:

- Secado químico. Se utilizará Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> o MgSO<sub>4</sub>. Se dejarán pasar varias horas desde la mezcla inicial de la muestra con el desecante hasta conseguir la completa deshidratación de la muestra.
- Liofilización. Se deberán minimizar las pérdidas por evaporación para lo cual se mantendrá la temperatura en la cámara de evaporación por debajo de 0°C. Asimismo, se reducirán los posibles procesos de contaminación cruzada entre muestras colocando una tapa con un orificio de unos 3 mm de diámetro en el recipiente de muestra.
- Secado al aire a temperatura ambiente. El ambiente deberá ser limpio y se realizará la determinación de la humedad residual.

### Extracción

Previamente al análisis, los compuestos deberán extraerse del sedimento mediante un disolvente orgánico. El proceso de extracción variará dependiendo de si los sedimentos han sido desecados o si se trata de sedimentos húmedos.

### *Muestras húmedas*

---

<sup>2</sup> El método recomendado se basa en el Anexo técnico 2 “*Determination of chlorobiphenyls in sediments - analytical method*” de las “*JAMP Guidelines for Monitoring Contaminants in Sediments*” (OSPAR Commission, Monitoring guidelines, Ref. No: 2002-16).

Los sedimentos húmedos se extraerán en un procedimiento escalonado mediante la mezcla con solventes orgánicos. Tal extracción se mejora con agitación, mezcla Ultra Turrax, vaso de molino de bolas o tratamiento con ultrasonidos. Se utilizarán solventes miscibles en agua (sobre todo en el primer paso), tales como metanol, acetona, acetonitrilo, etc. La eficacia de la extracción en el primer paso es baja, ya que habrá una cantidad considerable de agua en fase líquida. La extracción se continúa con una mezcla de disolventes polares y apolares (por ejemplo, acetona/hexano o metanol/diclorometano). Para una extracción suficiente de los compuestos de interés, los sedimentos húmedos deben ser extraídos con disolventes orgánicos por lo menos tres veces. El tiempo de contacto con el solvente debe ser suficiente para completar la desorción de los PCBs de los sedimentos.

Cuando se utiliza un Soxhlet, la extracción de los sedimentos húmedos se deberá realizar en dos pasos. En primer lugar, para extraer el agua de los sedimentos, se utilizará un disolvente polar, como la acetona, continuándose con una mezcla de disolventes polares/apolares, tales como acetona/hexano.

En ambos casos el agua se debe agregar a los extractos combinados y los PCBs se extraen con un disolvente apolar como el hexano.

#### *Muestras desecadas*

Los métodos de extracción para muestras desecadas podrán realizarse por sonicación, por el tradicional método Soxhlet o bien por alguna de las nuevas técnicas como extracción por microondas, extracción acelerada con solventes (ASE) o la denominada ESE (*Enhanced Solvent Extraction*) que constituyen igualmente alternativas aplicables siempre y cuando se desarrollen estrictos programas de optimización de acuerdo con la naturaleza de la muestra.

La extracción con ultrasonidos se realizará en etapas sucesivas comenzando con una extracción con un disolvente polar (por ejemplo acetona) seguida de extracciones sucesivas con un disolvente apolar (por ejemplo hexano, diclorometano o mezcla de ambos) con sonicaciones en cada paso de una duración en torno a 5 minutos. Los extractos recogidos se reconcentran bajo un disolvente adecuado para su análisis por cromatografía.

Para la extracción Soxhlet, se recomienda una mezcla de disolvente polar y apolar (por ejemplo acetona/hexano), considerándose una buena elección un 25% de acetona en hexano. Una mayor proporción de disolvente polar mejora la eficiencia de la extracción, pero el disolvente polar debe ser eliminado previamente al análisis cromatográfico. La extracción

puede realizarse tanto en Soxhlet normal como en caliente optimizando el número de ciclos (aproximadamente 8 horas para el Soxhlet en caliente y de 12 a 24 horas para el normal). La eficiencia de la extracción debe ser verificada para diferentes tipos de muestra mediante una extracción adicional a la anterior cuyo extracto se analizará de forma individual.

#### Limpieza del extracto (clean-up)

Antes de cualquier proceso de concentración es preciso añadir un hidrocarburo de alto peso molecular para evitar la evaporación por sequedad (por ejemplo isooctano).

Durante la primera fase del proceso de limpieza se eliminarán el azufre y sus compuestos. Para ello, al extracto se le añadirán isopropanol,  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  y tetrabutil amonio (TBA), posteriormente se eliminará el isopropanol mediante adición de agua. El exceso de  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  y sus productos de reacción pueden eliminarse con adición de agua y separando disolvente apolar y agua.

La segunda fase de limpieza estará destinada a la eliminación de otras sustancias interferentes coextraídas, como lípidos y HAPs, que podrán ser eliminados mediante el paso del extracto por columna de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  desactivada (5-10% de agua), sílice desactivado (1-5% de agua) o sílice activado (una noche a 180°C) y elución con un disolvente apolar (por ejemplo hexano o isooctano).

#### Etapa analítica

La técnica más recomendable para conseguir una buena separación de los compuestos es la cromatografía de gases de alta resolución. Resulta recomendable además, la utilización de dos columnas de diferente polaridad, para conseguir un buen aislamiento de los compuestos de interés. Deberán utilizarse columnas de al menos 50 m de longitud y un diámetro máximo de 0,25 mm, con un espesor de recubrimiento entre 0,2 y 0,4 micras, con fases estacionarias acordes con la aplicación.

El detector de captura de electrones (ECD) es el más ampliamente utilizado y recomendable, con muy buenas prestaciones en cuanto a sensibilidad y combinado con sistemas de detección de masas para la confirmación, constituye una alternativa idónea. Actualmente los sistemas basados en espectrometría de masas combinados (GC/MS/MS)

alcanzan sensibilidades suficientes o incluso superiores en muchos casos, no así los sistemas convencionales simples de ionización por impacto electrónico que no alcanzan en muchos casos las sensibilidades de éstos, por lo que resultan poco adecuados para cuantificaciones. Los sistemas de ionización química negativa son muy sensibles desde pentaclorados hasta decaclorados, aproximadamente 10 veces más que el ECD.

En cuanto a las calibraciones y control de calidad, es recomendable la realización punto a punto de una curva de al menos cinco niveles, utilizando un patrón interno y patrones de verificación de recuperación, simultaneando análisis de materiales de referencia para el control de la eficiencia de las fases preanalíticas y analítica.

#### **5.4.- Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs)**

Se determinarán<sup>3</sup> los 9 compuestos siguientes, recomendados por las Directrices OSPAR para la gestión del material dragado<sup>4</sup>: Antraceno, Benzo(a)antraceno, Benzo(ghi)perileno, Benzo(a)pireno, Criseno, Fluoranteno, Indeno(1,2,3-cd)pireno, Pireno y Fenantreno. Los resultados se expresarán en mg/Kg sobre materia seca.

#### Muestreo y conservación

Debido a que los HAPs son sensibles a la fotodegradación deberá evitarse la exposición a la luz solar u otras fuentes intensas, durante las fases de muestreo, almacenamiento, así como en la preparación de muestras incluyendo extracción y almacenamiento de los extractos. El material utilizado deberá ser de vidrio tintado, preferiblemente ámbar, o material de vidrio adecuadamente protegido.

#### Pretratamientos

---

<sup>3</sup> El método recomendado se basa en el Anexo técnico 3 “*Determination of PAHs in sediments*” de las “*JAMP Guidelines for Monitoring Contaminants in Sediments. OSPAR Commission, Monitoring guidelines, Ref. No: 2002-16.*”

<sup>4</sup> *OSPAR Guidelines for the Management of Dredged Material at Sea OSPAR Agreement 2014-6.*

Son de aplicación las pautas establecidas para los PCBs, con la salvedad de las precauciones que se deberán tomar para evitar los efectos de la fotodegradación.

### Extracción

Aunque podría realizarse sobre muestra húmeda, se recomienda realizar la extracción sobre muestra previamente desecada. Para muestra húmeda, se requerirá el empleo en la primera extracción de un disolvente miscible con el agua (acetona, metanol o acetonitrilo) y posteriormente sucesivas extracciones con disolventes menos polares.

En el análisis rutinario sobre muestra seca es recomendable la utilización de mezclas de disolvente polar y no polar (por ejemplo acetona/hexano). También pueden utilizarse disolventes de media polaridad como el diclorometano o tolueno.

Los sistemas tradicionales de Soxhlet constituyen una alternativa eficaz y sencilla, así como los tratamientos con ultrasonidos. Las nuevas técnicas como extracción por microondas, extracción acelerada con solventes (ASE) o la denominada ESE (*Enhanced Solvent Extraction*) constituyen alternativas aplicables y recomendables, siempre bajo estrictos programas de optimización de acuerdo con la naturaleza de la muestra.

### Limpieza del extracto (clean-up)

El extracto obtenido requerirá un proceso de purificación para eliminar todas aquellas sustancias interferentes que acompañan a los analitos de interés. La selección del método adecuado de limpieza dependerá del método instrumental que se vaya a utilizar. Previamente a esta etapa de limpieza será preciso concentrar el extracto y eliminar el disolvente polar utilizado en la extracción. Nunca se deben evaporar a sequedad los extractos. En general las interferencias más polares pueden eliminarse con una columna de óxido de aluminio (desactivado con un 10% de agua) y eluyendo con hexano.

Los análisis por GC/MS requerirán además una fase previa para la eliminación del azufre, en los términos comentados en la metodología de PCBs, o bien con tratamientos con polvo de cobre u otras alternativas.



## Etapa analítica

Para la separación de estos compuestos se puede recurrir tanto como a la cromatografía de gases como a la cromatografía de líquidos HPLC.

La opción de cromatografía de gases en combinación con detectores de masas suficientemente sensibles constituye una alternativa, especialmente eficaz cuando se utilizan sistemas combinados MS/MS. No resulta recomendable el uso de detector de ionización de llama FID, que, debido a su baja selectividad, puede presentar fácilmente desviaciones debidas a la coelución de sustancias interferentes.

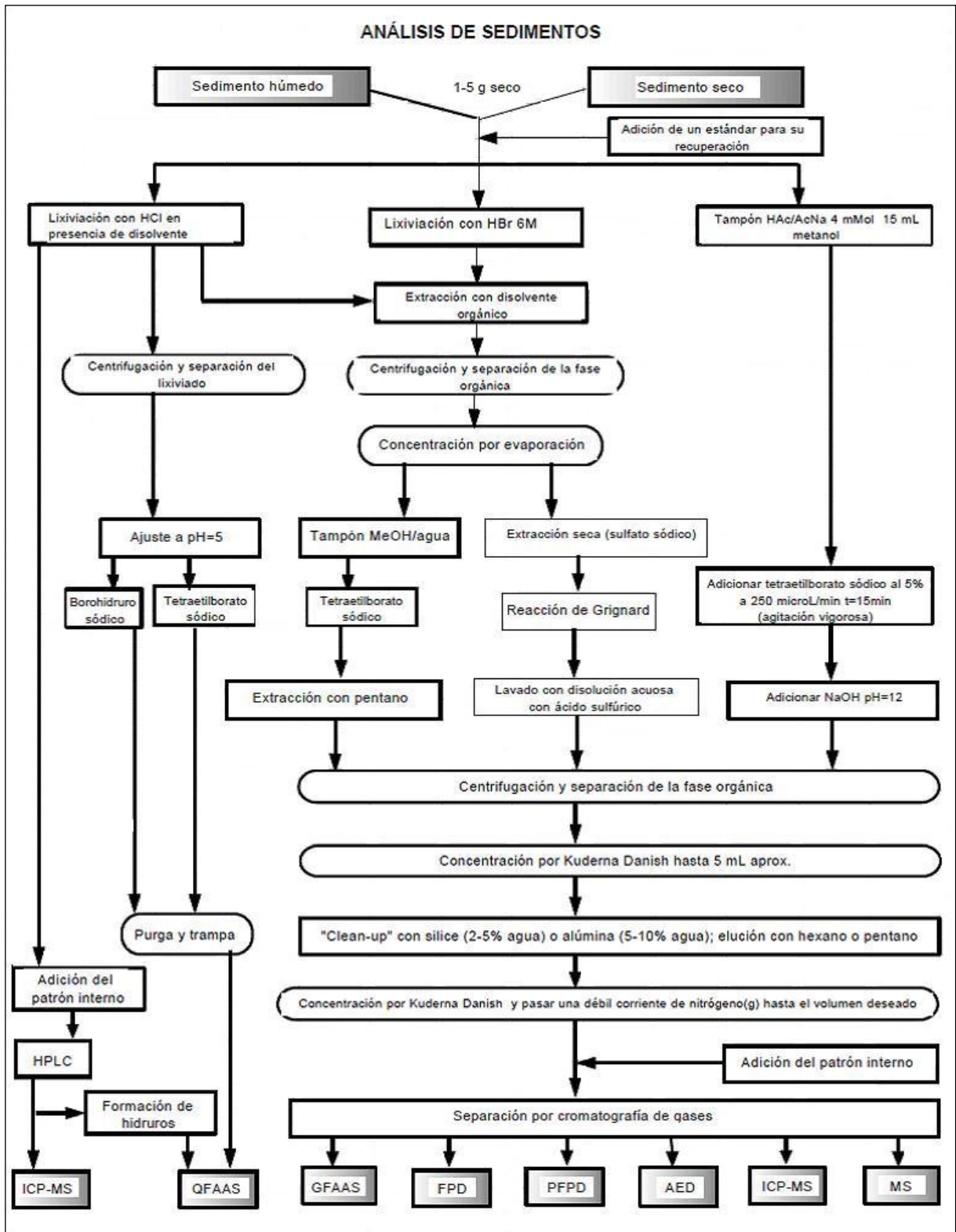
Por otra parte, los sistemas de HPLC en combinación con detección por fluorescencia y ultravioleta, constituyen una buena alternativa para la mayoría de los HAPs.

En cuanto a las calibraciones y control de calidad, es recomendable la realización punto a punto de una curva de al menos cinco niveles. Los detectores UV y de fluorescencia tienen un rango lineal bastante amplio, mientras que el de masas a menudo no lo es y además la respuesta de los compuestos puede ser distinta en las soluciones patrón y en la muestra por lo que podría ser preciso recurrir al método de adiciones. Deben utilizarse patrones internos, y patrones de verificación de recuperación, preferiblemente representantes de diversos tamaños de anillos, simultaneando análisis de materiales de referencia para el control de la eficiencia de las fases preanalíticas y analítica.

### **5.5.- Tributyl Estaño (TBT) y productos de degradación (DBT y MBT)**

La determinación de compuestos de butilestaño en sedimentos engloba una serie de procesos como la extracción, a menudo derivatización, clean-up, separación cromatográfica de compuestos y finalmente detección. Los procesos de extracción y derivatización, en sus múltiples variantes, pueden resultar frecuentemente incompletos, por lo que resulta indispensable un control exhaustivo de estas etapas mediante el uso de patrones de recuperación. Por lo que respecta a la separación puede realizarse tanto por cromatografía líquida, HPLC, como de gases, GC. Finalmente la gama de sistemas de detección es también amplia, encontrándose los detectores de masas, PFPD y AED, entre los más utilizados, aunque caben otras alternativas.

Con el fin de tener una visión esquemática del conjunto de alternativas metodológicas y de los pasos intermedios que cada una de ellas implica, se expone a continuación el esquema que a tal fin se recoge en el Anejo Técnico 4, de las “JAMP Guidelines for monitoring contaminants in sediments” de OSPAR, dedicado a estas metodologías, cuyas recomendaciones analíticas deberán ser tenidas en cuenta al abordar estas determinaciones.



### Control de blancos y contaminaciones

Deberá evitarse la utilización de solventes y reactivos que puedan contener compuestos de butilestaño. Al no existir procedimientos conocidos para eliminar los compuestos de alquilestaño del reactivo, deberán probarse distintos proveedores o preparar los reactivos en el laboratorio.

La limpieza del material de vidrio por los procedimientos habituales de limpieza suele ser suficiente para evitar efectos memoria y disminuir los blancos y otras interferencias. En casos de blancos excesivamente altos se debe proceder a la limpieza del vidrio con ácido nítrico concentrado, enjuagando con agua libre de organoestánicos y acetona.

El valor típico de los blancos de proceso es 0,3 ng Sn por compuesto o inferior.

### Pretratamientos

Son de aplicación las pautas establecidas para los HAPs.

Se deberá prestar especial atención al proceso de homogeneización de la muestra para obtener submuestras representativas sobre las que realizar la determinación analítica. Asimismo, deberán mantenerse los oportunos controles de homogeneidad a través de la realización de análisis replicados.

### Calibración

El método de calibración dependerá en gran medida de la técnica elegida para la determinación. Como norma general ofrecen mejores resultados las calibraciones realizadas con derivatización individual en cada uno de los puntos, siendo necesario, en muchas ocasiones, recurrir a adiciones estándar o preparación de un calibrado sobre un sedimento matriz, para obtener buenos resultados. Es imprescindible asimismo la utilización de patrones de recuperación para el control en cada una de las etapas, así como la adición de patrones internos.

Finalmente se expone un breve resumen de la metodología propuesta por el CEDEX en el informe técnico realizado para Puertos del Estado en noviembre de 2004 "Desarrollo y contraste de una metodología para la medida de compuestos organoestánicos en sedimentos y biota". Los dos documentos mencionados, constituyen una apropiada información de base a la hora de seleccionar la metodología adecuada, ya que recogen una amplia información en cuanto a la problemática de la diversa gama de alternativas metodológicas, con valoraciones de las mismas, así como información basada en el programa de desarrollo de metodologías QUASIMEME en este campo.

Resumen de metodología propuesta (CEDEX, informe técnico realizado para Puertos del Estado, noviembre de 2004 "Desarrollo y contraste de una metodología para la medida de compuestos organoestánicos en sedimentos y biota"):

- Masa de muestra: cantidad en húmedo equivalente a aproximadamente 2 g en seco.
- Adición de patrones de recuperación.
- Tratamiento ácido con HBr:H<sub>2</sub>O en proporción 3:2.
- Extracción con hexano y tropolona (al 0,05%).
- Derivatización con bromuro de pentil magnesio (2 mol/l).
- Adición de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 N, para parar la reacción.
- Recuperación de la fase orgánica y reconcentración.
- Clean-up en columna de Florisil.
- Reconcentración y adición de patrón interno.
- Determinación por GC/MS en modo SIM, monitorización selectiva de iones.

Independientemente de la técnica empleada el resultado se expresará en mg de Sn por Kg, proporcionando las concentraciones individualizadas de TBT, DBT y MBT, así como el sumatorio de los tres compuestos.

## 5.6.- Hidrocarburos (C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub>)

Se determinará el contenido de hidrocarburos en el rango de C<sub>10</sub>-C<sub>40</sub> por cromatografía de gases, conforme a la norma UNE-EN 14039 (Abril, 2005). De acuerdo con lo definido en la misma, con este método se determinan como hidrocarburos aquellos con rangos de ebullición de aproximadamente 175°C a 525°C, por ejemplo n-alcános desde C<sub>10</sub> H<sub>22</sub> a C<sub>40</sub> H<sub>82</sub>, isoalcános, cicloalcános, alquil bencenos, alquil naftalenos y compuestos policíclicos aromáticos, dando por supuesto que no se absorben en columna de Florisil durante la purificación, no estando, por tanto, determinados los hidrocarburos volátiles ni los compuestos más polares como grasas animales y vegetales.

## 6. BIOENSAYOS

### 6.1. TEST PREVIO DE TOXICIDAD (TPT)

El Test Previo de Toxicidad se realizará sobre la fracción inferior a 2 mm expresando los resultados como concentración CE50, es decir, como concentración que produce un 50% de disminución de la bioluminiscencia en miligramos de sedimento por litro de suspensión.

#### 1. Antecedentes:

El ensayo de toxicidad basado en la bioluminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri* se lleva a cabo de manera rutinaria en distintos países desde hace muchos años pero para muestras de sedimentos presenta el inconveniente de la interferencia que provoca la turbidez propia de la muestra y que conlleva una sobreestimación de su efecto tóxico sobre las bacterias. Aunque se han propuesto técnicas de filtrado para retirar la turbidez antes de la lectura final ninguna ha resultado totalmente satisfactoria. En 2005 T. Campisi y col. propusieron una modificación que consistía en la lectura de la luminiscencia inicial inmediatamente (en los 2 primeros segundos) tras la adición de la alícuota de ensayo, con lo que se consigue que la lectura de luminiscencia inicial conlleve implícita la reducción de luminiscencia debida a la turbidez sin que el efecto tóxico se haya manifestado aún (Lappalainen et al, 2001); transcurrido el tiempo de contacto la lectura de luminiscencia final se realiza en similares condiciones de turbidez tras la resuspensión del sedimento. Los resultados resultaron satisfactorios obteniéndose una corrección más realista, sencilla y efectiva, especialmente en los casos más problemáticos de baja toxicidad y alta turbidez.

El Laboratorio de Calidad del Medio Marino (CEPYC-CEDEX) ya desde los comienzos de la introducción del test de bioluminiscencia en la matriz que nos ocupa, en los años 90, ha ido acumulando una valiosa experiencia en la aplicación de las distintas variantes metodológicas del test en fase sólida a través de su aplicación en diferentes estudios de caracterización de fondos portuarios. Tales experiencias junto con las conclusiones globales y particulares obtenidas en un ejercicio de interlaboratorios (2004) condujeron a la conclusión de que el método de Campisi ofrecía mayores ventajas y mejores resultados en cuanto a reproducibilidad y correlación con las caracterizaciones químicas de contaminantes realizadas al incorporar un método de corrección de la turbidez sencillo y aparentemente eficaz.

Con las modificaciones propuestas este Test Previo de Toxicidad (TPT) constituye una herramienta eficaz para la determinación inicial de la toxicidad de los sedimentos procedentes del dragado portuario u otros sedimentos marinos que ofrece la sensibilidad y la rapidez deseada para un ensayo de “screening” de toxicidad.

El presente protocolo se fundamenta en las referencias bibliográficas expuestas al término del documento.

## **2. Objeto y ámbito de aplicación:**

Este método es aplicable a sedimentos de origen marino o de estuario, tales como los materiales de dragado.

## **3. Fundamento:**

Se determina la inhibición de la luminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri* mediante un ensayo que pone en contacto directo suspensiones de sedimento de concentraciones conocidas con una alícuota constante de reactivo bacteriano.

El criterio de evaluación del ensayo es la disminución de la luminiscencia para cada concentración de sedimento, medida a los 30 minutos teniendo en cuenta un factor de corrección que se obtiene a partir de la modificación de la luminiscencia por soluciones control no tóxicas. Un método estadístico sencillo permite calcular a partir de las distintas

concentraciones y sus efectos la CE50 o concentración efectiva que reduce la luminiscencia en un 50%.

#### **4. Interferencias:**

Para corregir la interferencia de la turbidez y el color de las muestras sobre las medidas de luminiscencia se aplicará el método desarrollado por Campisi y col. 2005 basado en la lectura de la luminiscencia inicial inmediatamente (en los 2 primeros segundos) tras la adición de la alícuota de ensayo, con lo que se consigue que la lectura de luminiscencia inicial conlleve implícita la reducción de luminiscencia debida a la turbidez sin que el efecto tóxico se haya manifestado aún (Lappalainen et al, 2001); transcurrido el tiempo de contacto, la lectura de luminiscencia final se realiza en similares condiciones de turbidez tras la resuspensión del sedimento.

#### **5. Reactivos:**

Las sustancias químicas empleadas serán de calidad analítica reconocida y el agua destilada o de pureza equivalente.

- Bacterias de ensayo

Las bacterias empleadas pertenecen a la especie *Vibrio fischeri*. Las suspensiones de bacterias se preparan a partir de reactivos comerciales liofilizados que se conservan congelados entre -18 y -20°C.

- Reconstituyente

Se empleará la solución de reconstitución de las bacterias recomendada por el proveedor de bacterias. Se conservará refrigerada a 4°C hasta el momento del ensayo.

- Diluyente



Se preparará la cantidad necesaria, en función del número de muestras a ensayar, de una solución de cloruro de sodio (NaCl, 35 g/l) en agua. Se conserva refrigerada a 4°C.

## **6. Material**

- Congelador (-20°C)
- Frigorífico (4°C)
- Baño termostático a 15°C con una variación máxima de temperatura durante los ensayos de 0,2°C
- Luminómetro con celda de medida termostaticada a 15°C
- Termómetro de precisión 0,1°C
- Viales de vidrio químicamente inerte compatibles con la celda de lectura del luminómetro y con capacidad para 2 ó más ml
- Vasos de precipitado, forma alta, de 150 ml
- Matraz Erlenmeyer de 100 ml
- Probetas de 100 ml
- Balanza de precisión (0,01 g)
- Cronómetro
- Pipetas automáticas regulables de 5 ml (opcional), 1 ml y 0,5 ml
- Agitadores magnéticos con barras agitadoras de 30 mm.

## **7. Muestreo y conservación de muestras**

Las muestras se tomarán y conservarán de acuerdo con los protocolos incluidos en el Anejo II. Los análisis deberán realizarse en el menor tiempo posible y en cualquier caso dentro de los 7 días posteriores a la toma de muestras.

## **8. Preparación de las muestras**

En primer lugar se tamizan las muestras a través de un tamiz de malla de 2 mm de material plástico. A continuación se calculará la humedad de cada muestra necesaria para el cálculo de la masa a utilizar para la preparación de la suspensión de ensayo.

Para cada muestra se ensayarán dos réplicas y un control negativo de toxicidad según el procedimiento que se describe a continuación.

## **9. Procedimiento**

El procedimiento de ensayo consta de las diez fases consecutivas siguientes:

- Preparación del baño a 15°C.
- Preparación de los viales.
- Preparación del diluyente estándar.
- Preparación de las soluciones de ensayo.
- Reactivación de las bacterias.
- Llenado de los viales de bacterias.
- Llenado de los viales de muestra.
- Estandarización del luminómetro.
- Medida de la luminiscencia inicial.
- Lectura de la luminiscencia final.

### **9.1. Preparación del baño termostático**

Se prepara un baño a  $15 \pm 0,5^\circ\text{C}$  con espacio suficiente para introducir 80 viales en la disposición indicada en la *figura 1*. Mientras se estabiliza la temperatura se realizan los pasos 9.2 y 9.3.

## 9.2. Disposición de viales en el baño termostático

Se preparan dos grupos idénticos de viales distribuyéndolos como en la *figura 1*. Esta distribución está diseñada para ensayar simultáneamente 4 muestras con 8 concentraciones cada una más sus controles correspondientes (en total 9 viales por muestra).

Los viales del grupo I serán los viales de lectura, rellenos inicialmente con la suspensión bacteriana (ver 9.4), a los que posteriormente tras las lecturas de luminiscencia inicial se añadirán las alícuotas correspondientes de las suspensiones de muestra y soluciones de control dispuestas de modo similar en los viales del grupo II (ver 9.8.).

En cada grupo cada fila corresponderá a los viales de una muestra completa de acuerdo con lo siguiente:

- Columna A: viales destinados a los controles negativos de cada una de las muestras.
- Columnas B-H: viales correspondientes a cada una de las concentraciones de la suspensión de ensayo de una muestra obtenidas por diluciones sucesivas.
- Columna I: viales correspondientes a cada una de las suspensiones madre con la máxima concentración a ensayar de cada muestra.

## 9.3. Preparación del diluyente estándar

Se prepara una solución de NaCl en agua desmineralizada con una concentración de 35 g/l

## 9.4. Preparación de la suspensión bacteriana

Sacar del congelador el tubo de reactivo de bacterias liofilizadas y seguir el protocolo de reconstitución recomendado por el fabricante, por ejemplo: añadir al vial de liofilizado de bacterias 1 ml de reconstituyente (a 4°C) y mezclar bien mediante pipeteos sucesivos. Una vez homogéneo, pasar todo el contenido a un matraz Erlenmeyer de 100 ml de capacidad con 50 ml de diluyente (9.3), a 15°C, y mantener en agitación durante 5 minutos dentro del baño termostático hasta garantizar la perfecta homogeneidad de la suspensión bacteriana.

El objetivo es conseguir una suspensión bacteriana directamente a la concentración final de uso establecida por el fabricante del preparado bacteriano para su dispensación directa en los viales de lectura (0,5 ml /vial, ver 9.5)

#### 9.5. Relleno de los viales de lectura (grupo I).

Cada uno de los viales del grupo I se rellena con 0,5 ml de la suspensión bacteriana (9.4).

Dejar estabilizar los viales así preparados durante 90 minutos\* antes de comenzar el ensayo de medida de la luminiscencia. En este intervalo de tiempo se irán realizando los pasos 9.6 a 9.8.

*\*Es conveniente realizar un estudio de estabilidad frente al tiempo de la suspensión bacteriana cuando se cambie de fabricante o lote de fabricación para asegurar que el ensayo se desarrolla en el periodo óptimo de actividad y estabilidad de las bacterias.*

#### 9.6. Relleno de viales con diluyente

Se rellenarán todos los viales del grupo II excepto el de la columna I, con 1 ml de diluyente (9.3).

A los viales de la columna A no se les añadirá nada más y servirán como controles de modo que tendremos un control por cada muestra a ensayar. Esto contribuirá a corregir las posibles variaciones de luminiscencia debidas a la posición de los viales en el baño o al tiempo transcurrido desde la preparación de los viales de bacterias hasta su lectura.

Los viales de las columnas B-H servirán para diluir al 50% de forma sucesiva la suspensión de muestra de los viales I preparada con arreglo al apartado 9.8.

#### 9.7. Pesada de las muestras

Se pesará en un vaso de precipitados de 150 ml una masa de muestra de 1,6 g corregida de acuerdo con el porcentaje de masa seca calculado previamente para cada una de ellas.

#### 9.8. Preparación de las suspensiones de muestras

A los vasos de precipitados con las muestras pesadas según el apartado anterior se les añaden 100 ml de diluyente 9.3 (1). A continuación se ponen en agitación durante 10 minutos empleando un agitador magnético con barra agitadora de 30 mm, a una velocidad que genere un vórtice que alcance aproximadamente la mitad de la altura de la suspensión (aproximadamente 600 r.p.m.).

Transcurridos los 10 minutos y sin detener la agitación, con ayuda de una pipeta automática cuya punta (2) se situará a 2 cm del fondo y próxima a la pared del vaso, se tomarán 2 ml de cada suspensión que se depositarán en los viales de la columna I del grupo II dedicando una fila a cada muestra.

(1) *De este modo se consigue una concentración de muestra de 16.000 mg/l que se reducirá al 50% (8.000 mg/l) en el momento de su adición sobre la suspensión bacteriana durante el ensayo al mezclar las suspensiones de muestra y de bacterias (apartado .9.4.), por lo que la concentración final ensayada será de 8.000 mg/l de sedimento seco en el caso de la suspensión madre.*

(2) *Para facilitar la operación se puede utilizar una pipeta ajustable en volumen (0,5 a 1 ml) y puntas de 1 ml a las que puede cortarse moderadamente la punta para evitar la obturación.*

Los viales de las columnas B-H servirán para ir preparando las diluciones sucesivas del dispersante a partir de la solución madre. Para ello se tomará 1 ml de suspensión madre del vial I después de mezclarlo bien y se añadirá al vial H. así sucesivamente se irán rellenando todos los viales hasta la columna B para obtener concentraciones en progresión geométrica con un factor 2.

*Es fundamental resuspender la muestra en cada vial pipeteando varias veces antes de añadirla al siguiente vial.*

Las concentraciones finales ensayadas serán la mitad de las preparadas en los viales del grupo II tras mezclar 0,5 ml de cada dilución con los 0,5 ml de bacterias del grupo I.

#### 9.9. Medida de la luminiscencia

Se tendrá preparada una tabla como la de la *figura 2* para anotar las lecturas de bioluminiscencia  $I_0$ ,  $I_0'$  e  $I_{30}$ . Entre cada dos viales de bacterias a medir se dispone de 50 segundos de margen de acuerdo con la configuración tomada como ejemplo en este protocolo. La configuración de tiempos propuesta podrá ajustarse en función del número de muestras que se ensayen simultáneamente teniendo en cuenta que cada vial deberá reposar 30 minutos exactos entre la lectura inicial con muestra  $I_0'$  y la final  $I_{30}$ .

Es importante secar bien la parte exterior de los viales antes de introducirlos en el luminómetro. También sacar los viales del baño con cuidado para evitar que entre agua en los viales contiguos.

##### A. Estandarización del luminómetro

Antes de comenzar el proceso de lecturas se introduce en la celda de medida un vial cualquiera de suspensión bacteriana (grupo I) agitado y se estandariza la lectura a un 100% de luminiscencia.

##### B. Medida de la lectura inicial sin muestra ( $I_0$ )

El ensayo comienza agitando el primer vial de bacterias (1 del grupo I), midiendo la luminiscencia y anotando la lectura como  $I_0$  en la casilla correspondiente.

##### C. Medida de la lectura inicial con muestra ( $I_0'$ )

Inmediatamente después del paso anterior (B) y sin sacar el vial de bacterias del luminómetro se le añaden 0,5 ml del vial correspondiente (1 del grupo II) y se anota la nueva lectura como  $I_0'$ . La *figura 3* puede servir de orientación.

Se pone en marcha el cronómetro.

El vial control (1 del grupo II) se desecha y el de bacterias se devuelve a su posición en el baño hasta su nueva lectura tras los 30 minutos de incubación.

Cada 50 segundos se repiten los pasos B y C con los sucesivos viales de bacterias y muestras/controles hasta completar todas las lecturas de  $I_0$  e  $I_0'$ , siguiendo la tabla de tiempos y lecturas predefinida propuesta en la *figura 2*.

*Es fundamental resuspender la muestra en el vial pipeteando varias veces antes de añadirla al vial de lectura.*

#### D. Medida de la lectura final ( $I_{30}$ )

Transcurridos los 30 minutos de incubación del primer vial 1-Grupo I, se agita de nuevo para resuspender la suspensión y realizar la lectura de la  $I_{30}$  en similares condiciones de turbidez a la realizada para la  $I_0'$ . Realizar la lectura de la  $I_{30}$  y anotar. Cada 50 segundos se irán agitando, leyendo y anotando las  $I_{30}$  de cada uno de los viales restantes de acuerdo con el orden establecido en la tabla de la *figura 2*.

*Es fundamental resuspender la muestra agitando el vial antes de realizar la lectura.*

## 10. Evaluación

### 10.1. Criterios de validez

La medida de  $I_0$  se emplea sólo para confirmar la estabilidad de las bacterias a lo largo del ensayo.

Para cada muestra se calcula el factor de corrección a partir de las lecturas de los viales control:

$$K = \frac{I_{30 \text{ control}}}{I_{0' \text{ control}}}$$

Los valores de  $k$  deben estar comprendidos entre 0,6 y 1,4.

### 10.2. Cálculo del efecto

Para el cálculo de la inhibición se utilizan los valores de  $I_0'$  e  $I_{30}$ .

Se obtendrá un valor  $k$  para cada control que se aplicará al cálculo del efecto para cada una de las concentraciones de la muestra correspondiente.

El efecto de inhibición para cada concentración se calcula a partir de las  $I_0'$  e  $I_{30}$  aplicando el valor de  $k$  del control correspondiente:

$$\% \text{ efecto} = 100 \cdot \left( 1 - \frac{I_{30 \text{ muestra}}}{k \cdot I_{0' \text{ muestra}}} \right)$$

### 10.3. Cálculo de la CE50



El cálculo de la CE50 se realiza mediante una regresión estadística del logaritmo de la concentración frente al logaritmo del parámetro  $\Gamma$ , siendo:

$$\Gamma = \left[ \frac{(k \cdot I_0')}{I_{30}} \right] - 1$$

Esto permite estimar el valor de la CE50 como la concentración correspondiente a  $\Gamma=1$ , es decir, aquella a la que la luminiscencia inicial es el doble de la final.

Algunos equipos incorporan un programa informático que permite calcular la CE50 en mg/l o ppm de cada réplica a partir de los datos de concentración y de  $I_0'$  e  $I_{30}$  proporcionando también el intervalo de confianza al 95%.

## **11. Informe de ensayo**

El informe de ensayo hará referencia a esta norma e incluirá la siguiente información:

- Identificación de la muestra de sedimento;
- Fecha y procedimiento de muestreo y tiempo y técnica de conservación;
- Fecha de realización del ensayo;
- Origen de las bacterias, número de lote, fecha de caducidad y modo de conservación;
- Tiempo de estabilización de las bacterias;
- Resultados según la tabla de la figura 2;
- Cualquier modificación de este método y cualquier circunstancia que haya podido influir en los resultados;
- Resultado de CE50 obtenido para cada una de las muestras.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	
GRUPO I	1 <sup>o</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	2 <sup>o</sup>	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	3 <sup>o</sup>	19	20	21	22	23	24	25	26	27
	4 <sup>o</sup>	28	29	30	31	32	33	34	35	36

GRUPO II	1 <sup>o</sup>	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	2 <sup>o</sup>	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	3 <sup>o</sup>	19	20	21	22	23	24	25	26	27
	4 <sup>o</sup>	28	29	30	31	32	33	34	35	36

Figura 1. Ejemplo de posición de los viales en el baño termostático (4 muestras)

TEST DE TOXICIDAD ( <i>V. fischeri</i> )				MÉTODO: TPT					
campaña:		<input type="text"/>		Lote bacterias:		<input type="text"/>			
fecha muestreo		<input type="text"/>		Caducidad:		<input type="text"/>			
Operador:		<input type="text"/>		Fecha ensayo:		<input type="text"/>			
				tº estabilización:		<input type="text"/>			
Viales de medida: 0,5 ml de muestra + 0,5 ml de suspensión bacteriana									
		[INICIAL]	[FINAL]	MIN	nº VIAL	lo	lo'	MIN.	I <sub>30</sub>
MUESTRA		0	0	0:00:00	1			0:30:00	
	% SECO	125	63	0:00:50	2			0:30:50	
		250	125	0:01:40	3			0:31:40	
		500	250	0:02:30	4			0:32:30	
		1.000	500	0:03:20	5			0:33:20	
	MASA HÚMEDA	2.000	1.000	0:04:10	6			0:34:10	
		4.000	2.000	0:05:00	7			0:35:00	
		8.000	4.000	0:05:50	8			0:35:50	
		16.000	8.000	0:06:40	9			0:36:40	
MUESTRA		0	0	0:07:30	10			0:37:30	
	% SECO	125	63	0:08:20	11			0:38:20	
		250	125	0:09:10	12			0:39:10	
		500	250	0:10:00	13			0:40:00	
		1.000	500	0:10:50	14			0:40:50	
	MASA HÚMEDA	2.000	1.000	0:11:40	15			0:41:40	
		4.000	2.000	0:12:30	16			0:42:30	
		8.000	4.000	0:13:20	17			0:43:20	
		16.000	8.000	0:14:10	18			0:44:10	
MUESTRA		0	0	0:15:00	19			0:45:00	
	% SECO	125	63	0:15:50	20			0:45:50	
		250	125	0:16:40	21			0:46:40	
		500	250	0:17:30	22			0:47:30	
		1.000	500	0:18:20	23			0:48:20	
	MASA HÚMEDA	2.000	1.000	0:19:10	24			0:49:10	
		4.000	2.000	0:20:00	25			0:50:00	
		8.000	4.000	0:20:50	26			0:50:50	
		16.000	8.000	0:21:40	27			0:51:40	
MUESTRA		0	0	0:22:30	28			0:52:30	
	% SECO	125	63	0:23:20	29			0:53:20	
		250	125	0:24:10	30			0:54:10	
		500	250	0:25:00	31			0:55:00	
		1.000	500	0:25:50	32			0:55:50	
	MASA HÚMEDA	2.000	1.000	0:26:40	33			0:56:40	
		4.000	2.000	0:27:30	34			0:57:30	
		8.000	4.000	0:28:20	35			0:58:20	
		16.000	8.000	0:29:10	36			0:59:10	

Figura 2. Ejemplo de tabla para lecturas de luminiscencia (4 muestras)

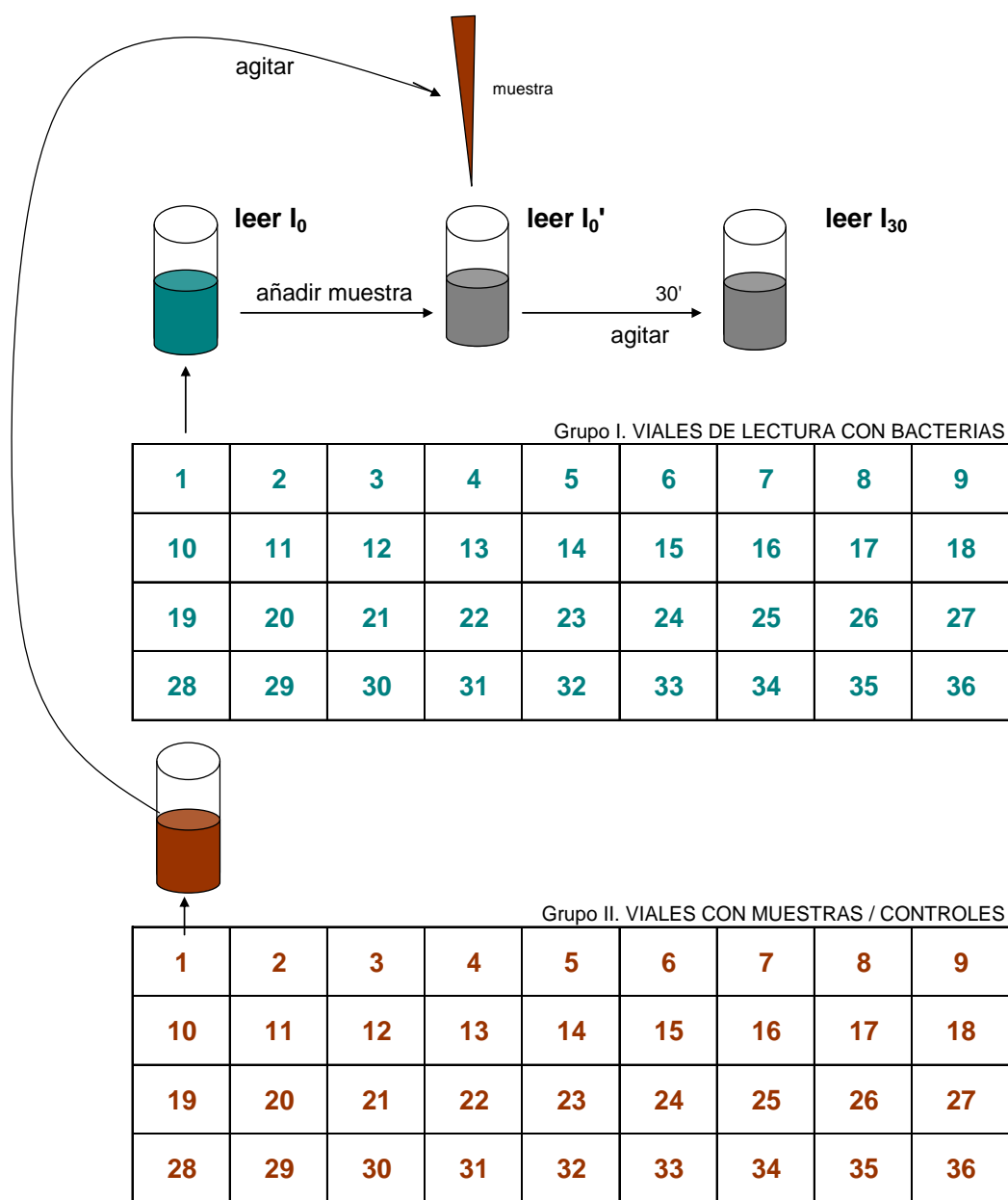


Figura 3. Procedimiento para las lecturas de bioluminiscencia

## 6.2. BIOENSAYO EN FASE LÍQUIDA BASADO EN LA EMBRIOGÉNESIS DEL ERIZO DE MAR *Paracentrotus lividus*

### 1. Introducción

Distintas especies de equinodermos se han empleado tradicionalmente en la evaluación ecotoxicológica de sedimentos (Geffard et al., 2000; Marina et al., 2001; Brils et al., 2002; Volpi Ghirardini et al., 2005; Giuliani et al., 2007) y han sido expuestas a distintos tipos de contaminantes tales como surfactantes (Volpi Ghirardini et al., 2001), pesticidas (Dinnel et al., 1989) o metales (Fernández & Beiras, 2001).

La aplicación ecotoxicológica de equinodermos está ampliamente estandarizada, se incluye en diversas reglamentaciones nacionales para la gestión del material de dragado (Environment Canada, 1992; RIKZ, 2000; ASTM, 2004; ICRAM-APAT, 2006) y ha sido sometida de forma satisfactoria a ensayos de intercalibración (Arizzi Novelli et al. 2007).

Los bioensayos con estadios embrionarios y larvarios de invertebrados marinos son considerados un método rápido y sensible para la caracterización de la ecotoxicidad de los sedimentos marinos.

La obtención de gametos y su fecundación in vitro son simples y debido a la rapidez con que se completa el desarrollo embrionario pueden obtenerse resultados en un corto periodo de tiempo (Casado-Martínez, et al. 2006).

Existen abundantes y relevantes investigaciones relativas a distintos efectos de la contaminación sobre la especie *Paracentrotus lividus*, tales como la bioacumulación (Radenac et al., 2000), el crecimiento larvario temprano (Fernández & Beiras, 2001; Fernández Méijome et al., 2006), la embriogénesis (Fernández & Beiras, 2001; Volpi Ghirardini et al., 2003; Arizzi Novelli et al., 2004) y el éxito en la fecundación (Volpi Ghirardini et al., 2003; Arizzi Novelli et al., 2004; Lera et al., 2006; Lera & Pellegrini, 2006) que fundamentan el presente protocolo. La posibilidad de estudiar efectos ecotoxicológicos subletales resulta especialmente interesante teniendo en cuenta la tendencia internacional existente (Convenio de Londres, 2008) en esa dirección para la caracterización ecotoxicológica del material a dragar.

La selección de la especie *Paracentrotus lividus* para el desarrollo de este protocolo se fundamenta además en su amplia distribución en las costas españolas y en la posibilidad de ser cultivado en laboratorio (Catoira Gómez et al., 1995; Spirlet et al., 2001; Kelly, 2005; Schlosser et al., 2005; Plan Nacional del Cultivo del Erizo 2006-2009).

El presente protocolo se fundamenta en las referencias bibliográficas expuestas al final del documento.

## 2. Equipo y material necesarios

### Material

- Erizos *Paracentrotus lividus*, maduros (30-60 mm de diámetro de testa).
- Sedimento problema.
- Sedimento control de un área libre de contaminación.
- $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (1.000 mg/ℓ).
- Algas frescas, mejillones o pienso seco.
- Agua de mar natural filtrada por 30 μm para el mantenimiento de adultos y por 0,22 μm (o agua de mar sintética<sup>5</sup>) para la realización de los lixiviados.

---

<sup>5</sup> Existen preparados comerciales de uso en acuarofilia que pueden ser utilizados. Para la preparación en laboratorio de agua de mar sintética se recomienda (para 1 ℓ) añadir las sales en el orden indicado a un volumen del 70% del volumen final deseado (700 ml de agua de mar) de agua ultrapura, y al final se enrasa al volumen final. Cada sal debe estar bien mezclada antes de añadir la siguiente. Se mantiene la disolución en agitación continua durante al menos una hora. Todas las sales deben tener calidad PA (para análisis) (Lorenzo J.I., Nieto O., Beiras R., 2002)

Sal	Cantidad (g)
-----	--------------

- Agua desionizada.
- Formaldehído al 40%.
- KCl 0,5M.
- Guantes.
- Baño termostático.
- Contenedor con tapa para el transporte de los erizos del lugar de captura al laboratorio.
- Contenedores para el mantenimiento de los erizos en el laboratorio.
- Sistema de aireación.
- Cámara de recuento de plancton.
- Cuchara o espátula de teflón.
- Frascos de agitación de capacidad adecuada.
- Micropipetas dispensadoras.

---

1.- NaF	0.003
	0.024
2.- SrCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.0475
3.- Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> 10H <sub>2</sub> O	0.100
	0.700
4.- KBr	1.47
	4.00
5.- KCl	10.78
6.- CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	24.50
7.- Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.200
8.- MgCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	
NaCl	
NaHCO <sub>3</sub>	

- Probeta de vidrio de 10 ml.
- Sonda multiparamétrica o similar para medición del amonio no iónico, nitritos, oxígeno disuelto, pH, salinidad y temperatura.
- Vasos de precipitados de vidrio (50 ml y de mayor capacidad).
- Volteador/agitador rotatorio.
- Microscopio invertido.

### **Requerimientos mínimos de laboratorio**

El lugar de trabajo donde se realice el bioensayo cumplirá con la normativa nacional existente en materia de seguridad laboral prestándose especial atención al cumplimiento de las Normas Técnicas de Prevención elaboradas por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

Todo equipo o recipiente que vaya a entrar en contacto con el sedimento, el agua sobrenadante o los organismos de ensayo habrá de ser limpiado correctamente antes de su uso.

### **Especie**

El presente protocolo de ensayo es válido para la especie de equinodermo *Paracentrotus lividus*.

### **Recolección y mantenimiento**

*Recolección de animales:*

- Los organismos a emplear se recogerán de localizaciones costeras limpias, bien directamente en agua superficial en marea baja, o bien mediante buceo. También cabe la opción de comprar los organismos a un proveedor.



- El número de organismos a obtener será tal que permita llevar a cabo las pruebas previas de maduración de los gametos, los ensayos de las muestras problema y control, y la del tóxico positivo de referencia con el mismo lote de organismos.
- El transporte de los organismos se realizará en contenedores con tapa. No hace falta rellenarlos parcialmente con agua, porque es más difícil mantener la temperatura (el agua se calienta). Lo mejor es mantener la humedad con un lecho de algas recolectadas en el mismo lugar que los erizos o con una toalla mojada. El mejor contenedor es una nevera portátil o algún contenedor que mantenga la temperatura (es muy importante para evitar puestas no deseadas). Con este fin también puede ser recomendable incluir algún paquete de gel helado (no muchos para evitar cualquier tipo de congelación y solo mantener la temperatura). Dependiendo de la duración del transporte puede ser necesario airear el agua del contenedor.
- Los individuos habrán de ser maduros y grávidos para poder obtener los gametos, por lo que se recomienda la recolección de organismos de un diámetro comprendido entre 30 y 60 mm. El diámetro a medir es el diámetro de testa, sin espinas.

#### *Condiciones de mantenimiento y aclimatación:*

- No existe una limitación específica del tiempo máximo que los organismos adultos pueden pasar en el laboratorio antes de proporcionar los gametos necesarios para el ensayo de ecotoxicidad.
- Si se realiza el ensayo el mismo día de recolección de los erizos no será necesaria su aclimatación. En caso contrario, se requiere que los erizos estén 4 días antes de que dé comienzo el ensayo, en las condiciones de temperatura y en el agua que se empleará en el control del ensayo. Si la diferencia de temperatura entre el lugar de procedencia de los erizos de mar y la temperatura a la que se mantienen en aclimatación es de entre 8 y 10°C, el periodo de aclimatación se extenderá hasta los 7 días para evitar una alta variabilidad en el porcentaje de huevos fecundados. Cuando la diferencia de temperatura llega a ser del orden de los 15°C el periodo de aclimatación se prolonga hasta las tres semanas.
- Los animales se mantendrán en el laboratorio en contenedores con agua de mar filtrada (30  $\mu$ m) o sintética procedente de su lugar de muestreo o, en caso de comprarlos a un proveedor, del lugar de muestreo del control. La cantidad de agua de mar en cada tanque será tal que proporcione una profundidad  $\geq 20$  cm de agua. El número de erizos por tanque será  $\leq 20$  para evitar la puesta no deseada.
- Los contenedores estarán dotados de sistemas de aireación y filtros para mantener el agua de mar en condiciones óptimas.

- Las condiciones de mantenimiento en el/los tanques de aclimatación serán las siguientes:
  - Temperatura del agua de mar ajustada a  $18\pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , no debiendo exceder los cambios de temperatura los  $3^{\circ}\text{C}$  al día;
  - Salinidad del agua de mar  $35\pm 1$  psu;
  - baja intensidad de luz y fotoperiodo natural sobre los tanques (las condiciones de iluminación no se consideran críticas para esta especie);
  - pH del agua de mar entre 7.8 y 8.2. Si el valor del pH no está comprendido entre estos valores, se habrá de ajustar a ellos mediante la adición de soluciones ácidas o básicas (ácido clorhídrico o hidróxido sódico de concentración inferior o igual a 1N), según proceda;
  - sistema de aireación capaz de mantener una concentración de oxígeno disuelto en el agua de mar superior o igual al 90%;
  - se controlarán diariamente los niveles de amonio no iónico (debe de ser inferior o igual a  $0,02\text{ mg/l}$ ) y nitritos (debe de ser inferior o igual a  $0,06\text{ mg/l}$ ). En caso de riesgo de alcanzar niveles peligrosos de ambos compuestos se procederá a la renovación de la totalidad del agua del tanque/s de aclimatación;
  - alimentación a base de algas frescas (*Laminaria digitata*, *Litophyllum* sp. o *Ulva* sp.), mejillones (*Mytilus edulis*) o pienso seco a obtener de proveedores (en base a proteína de soja o de pescado, por ejemplo). La alimentación *ad libitum* asegura tanto la calidad como la cantidad del rendimiento sexual;
  - limpieza diaria de los tanques (restos de comida y heces). Además, el/los tanque/s de aclimatación se fregarán y limpiarán cada vez que se introduzca un nuevo lote de organismos;
  - registro diario de la mortalidad de los organismos, que debe de ser inferior o igual al 2% por día de media durante los 4 días previos a la recogida de gametos. Los animales enfermos (pérdida significativa de espinas, ausencia de actividad de los pies ambulacrales, falta de adhesión al sustrato) se descartan.
- Las condiciones de mantenimiento se considerarán satisfactorias si se obtienen gametos viables que cumplan con los requerimientos del ensayo.
- Se consigue mantener un *stock* de individuos maduros de *P. lividus* todo el año manteniendo a los individuos a altas temperaturas (entre  $18$  y  $20^{\circ}\text{C}$ ) y bajo un fotoperiodo fijo de 12:12 horas o, mejor aún, en total oscuridad, lo que conduce a una alteración de su ciclo reproductivo.

### **3. Procedimiento de ensayo**

#### **Recolección de la muestra**

Las muestras problema y control se recogerán y manipularán siguiendo lo indicado en el Anejo II de estas Directrices. Se mantendrán en recipientes sellados, libres de aire y debidamente etiquetados. La información a recoger en las etiquetas aparece descrita a continuación:

- Naturaleza, apariencia, volumen y/o peso de cada muestra;
- Procedimiento y aparato de muestreo;
- El esquema de muestreo;
- El tipo y número de contenedores empleado para el transporte de las muestras;
- Temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto de la capa de agua sobrenadante del lugar de muestreo;
- Condiciones de transporte de las muestras hasta el laboratorio.

Durante el transporte, las muestras se mantendrán en oscuridad y a  $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$  empleando hielo o paquetes de gel helado.

#### **Determinación de las condiciones de ensayo**

A su llegada al laboratorio, y siempre hasta su uso, las muestras se mantendrán refrigeradas, a  $4^{\circ}\text{C}$ , nunca congeladas, libres de aire y en oscuridad. Caben para ello dos posibilidades, o bien se llenan los recipientes de ensayo en su totalidad para evitar la disponibilidad de oxígeno en su interior, o bien se purga el aire presente en el espacio libre de muestra del recipiente con gas nitrógeno. Se recomienda comenzar el bioensayo lo antes posible y, en todo caso, antes de las tres semanas posteriores a la toma de la muestra.

El ensayo se realizará sobre el lixiviado de la fracción de la muestra menor de 2 mm,

La tabla 1 recoge un resumen de las condiciones en las que el ensayo ha de llevarse a cabo. El incumplimiento de dichas condiciones implicaría la no validez del bioensayo en cuanto a la determinación de la ecotoxicidad del sedimento objeto de estudio.

<b>Tabla 1. Condiciones en las que se ha de desarrollar el bioensayo de éxito de la embriogénesis en <i>Paracentrotus lividus</i> con material de dragado</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Condiciones</b>
Tipo de ensayo	Estático, sobre lixiviado de sedimento (250g + 1 l)
Temperatura del medio de ensayo	20°C
Salinidad del medio de ensayo	35 psu
Fotoperiodo	Oscuridad
Contenedores/tubos de ensayo/viales de ensayo	20 ml de capacidad y de vidrio
Renovación del agua	Ninguna
Calidad del material biológico	Comprobar el estado de óvulos y esperma.
Tamaño de los erizos de mar (diámetro de la testa)	30-60 mm
Número de organismos por ensayo	3 machos y 3 hembras
Número de réplicas	Un mínimo de 5, también en el control.
Alimentación	No
Aireación del lixiviado	20 minutos antes del ensayo
Duración del ensayo	48 horas
Punto final a medir	Éxito de la embriogénesis y anomalía larvaria o crecimiento larvario.
Aceptabilidad del ensayo	Éxito en la embriogénesis (y desarrollo normal de las larvas) o crecimiento larvario en el control $\geq 85\%$

### **Desarrollo del ensayo**

Se expone a continuación un desarrollo temporal pormenorizado del ensayo:

***Día anterior al comienzo del ensayo (día -1):***

- Obtención del lixiviado (válido para sedimentos problema y control):
  - Se homogeneiza la muestra de sedimento mediante una cuchara o espátula de teflón;
  - Se depositan en un frasco de agitación 250 g de sedimento a los que se añade 1 l de agua de mar natural filtrada (0,22 µm) o sintética en una proporción de 1:4 (m/m, sedimento:agua). Se elegirá el tamaño del frasco de manera que quede lo más lleno posible y la capa superior de aire sea tal que se minimice la pérdida de sustancias volátiles durante el proceso de elutriación. Se procede a tapar el frasco;
  - La mezcla así preparada se somete a agitación rotatoria (50 rpm) a temperatura ambiente durante 30 min;
  - Transcurrido este tiempo se deja decantar el sedimento contenido en los frascos cerrados durante al menos 12 h en condiciones de oscuridad y a 4°C;
  - Transcurrido este tiempo se extraen por succión 500 ml del sobrenadante con los que se realizará la totalidad del ensayo;
  - El lixiviado debe utilizarse tan pronto sea posible; y en todo caso, se almacenará, a 4°C y en condiciones de oscuridad, por un tiempo máximo de 24h. Transcurrido este tiempo, habrá de ser descartado;
  - Previo a su empleo en el ensayo se procederá a la aireación del lixiviado durante 20 minutos mediante un agitador magnético con la mínima agitación necesaria. Se pretende así evitar la pérdida de compuestos químicos volátiles de la solución, o aumentar su tasa de oxidación y degradación a otras sustancias.
  - En caso de no estar disponibles sedimentos de características similares a las de los materiales a ensayar y exentos de contaminación de forma contrastada, se utilizará como control el agua utilizada para preparar los lixiviados.

- Se analizan mediante procedimientos estándar pH, salinidad, oxígeno disuelto y temperatura en el/los tanques de aclimatación de los erizos de mar, para garantizar el cumplimiento de las condiciones de ensayo.

***Día de desarrollo del ensayo (día 0):***

- Obtención de gametos. Existen dos opciones:

***Opción A: por estimulación de la puesta.***

- a) Estimulación, recogida y almacenamiento del esperma: se estimula la puesta de 3 adultos machos (tomados de forma aleatoria del tanque de aclimatación) mediante inyección de cloruro potásico –KCl- (1.0 ml de KCl 0,5M, preparada por disolución de 3.75g de KCl en 100 ml de agua desionizada) a través de la membrana peristomial al celoma (ver Figura 4, Peristomial membrane). Se deposita cada uno de los erizos en un vaso de precipitados (de vidrio, previamente limpiado con agua de mar control) colocado con su superficie aboral hacia abajo. Si transcurridos 10 min desde la inyección no se produce la puesta, se puede repetir una vez más la inyección de KCl. La liberación de esperma ha de producirse como máximo en la media hora posterior a la realización de la segunda inyección. A continuación se mezcla el esperma obtenido de los 3 machos para evitar variaciones en la reproducibilidad del ensayo, se recoge del fondo del recipiente y se transfiere a un tubo de ensayo que, una vez cerrado, se conserva a 4°C durante un tiempo máximo de 4 h. Transcurrido este tiempo se pone en contacto con agua de mar, y se emplea en el bioensayo en los siguientes 30-120 min.
  
- b) Estimulación, recogida y almacenamiento de los óvulos: se estimula la puesta de 3 erizos hembra (tomados de forma aleatoria del tanque de aclimatación) de igual forma que la descrita para los erizos machos. A continuación, se deposita cada uno de los erizos en un vaso de precipitados (de 50 ml de volumen, de vidrio, previamente limpiado con agua de mar) colocado con su superficie aboral hacia abajo. Seguidamente, se llena hasta el borde con agua de mar a temperatura ambiente. Una vez terminada la puesta, se separa tanta agua de los gametos como sea posible. Los óvulos recogidos se lavan 3 veces diluyéndolos con 100 ml de agua de mar, se mezclan, se dejan reposar

10 min, y se decantan (los óvulos dañados tienden a flotar). Finalmente, se mezclan los óvulos obtenidos de las 3 hembras en un vaso de precipitados de vidrio de mayor tamaño para evitar variaciones en la reproducibilidad del ensayo. Los óvulos pueden mantenerse en la última dilución de agua de mar durante 4h hasta su empleo. Se recomienda que se aireen suavemente durante este tiempo.

- c) La recogida de gametos masculinos y femeninos ha de terminar en los 15 min posteriores al comienzo de la puesta. De no ser así, deberá repetirse el proceso de estimulación y recogida de gametos con nuevos individuos.

**Opción B: por disección:** se diseccionan los erizos machos y hembras por el plano ecuatorial y se extraen los gametos de las gónadas con una pipeta.

Sea cual fuere la opción elegida para la obtención de los gametos, se deberán conservar a 4° C durante un periodo máximo de 4 horas, plazo máximo para el inicio del bioensayo.

- Fecundación:

Se comprueba al microscopio que los gametos son viables (esperma móvil y óvulos esféricos) y en menos de 30 min se introducen primero los óvulos en una probeta con agua de mar y después unos microlitros de esperma, agitando suavemente la suspensión para facilitar la interacción. A los 2 ó 3 min aparece en los huevos una membrana de fecundación (figura 5) que indica que la fecundación ha tenido lugar. Se calcula el porcentaje de fecundación, que debe ser como mínimo del 95%. Es recomendable que la densidad de huevos fecundados en esta suspensión no sea inferior a 6.000 huevos por ml, con el fin de que la alícuota a tomar para la siguiente fase de exposición, no sea superior a 0,1 ml.

- Exposición:

Se introducen 600-800 huevos fecundados en los recipientes previamente preparados con 20 ml del lixiviado (20 ml de agua de mar filtrada o sintética para los controles) mediante una alícuota (deseable <0,1 ml, para no alterar significativamente el volumen final) de la suspensión preparada en el punto anterior. Se incuban en oscuridad a 20°C durante 48 h.

- Recuento de larvas:

A las 48 h de incubación se fijan las larvas con unas gotas de formaldehído al 40% (1 ml de formaldehído/10 ml de lixiviado para obtener una concentración final del 4%) para el posterior recuento de larvas pluteus normales y anormales.

#### **4. Punto final del ensayo y tratamiento de datos**

- El punto final a medir en este ensayo es el éxito en la embriogénesis o el crecimiento larvario.
- Para ello, en cada réplica se observa el éxito en la embriogénesis sobre 100 individuos, registrado como porcentaje de larvas pluteus normales. Estas larvas se definen como aquellas con los cuatro brazos claramente diferenciados.
- Para determinar el crecimiento larvario, se observa en microscopio invertido y se mide el tamaño (dimensión máxima) de los primeros 35 individuos de cada réplica (tales individuos podrán incluir tanto larvas normales como estados anteriores de desarrollo). Se considerarán larvas normales aquellas cuya dimensión máxima se corresponde con una longitud aproximada de 300  $\mu\text{m}$  (Saco-Álvarez et al, 2010; Beiras et al, 2012). Es conveniente fijar con formaldehído una serie de viales con huevos sin fertilizar al inicio del bioensayo, cuyo diámetro se restará de la dimensión máxima de cada individuo para estimar el crecimiento larvario. El resultado se expresa como porcentaje respecto al control.
- El ensayo se considera válido cuando las larvas normales en el control (todas las réplicas) sean al menos el 85% o cuando la longitud larvaria sea mayor de 300  $\mu\text{m}$ .

#### **5. Procedimiento para el ensayo del compuesto tóxico de referencia**

- Este ensayo habrá de realizarse una vez al mes, en los meses en los que se realice el ensayo.
- El ensayo se desarrollará, siempre que sea posible, simultáneamente al ensayo de ecotoxicidad del lixiviado de sedimento.
- A menos que se indique lo contrario, todas las condiciones y procedimientos para preparar y llevar a cabo el ensayo serán idénticas a las ya descritas en el presente protocolo. El criterio de aceptación del ensayo también se mantiene.



- El ensayo se realiza sobre una solución del tóxico de referencia, en lugar de sobre lixiviado de sedimento.
- El tóxico de referencia a emplear es una solución estándar de absorción atómica de cobre:  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$  (1000 mg/l).
- La solución estándar se diluye (1:1000) añadiendo agua bidestilada.
- El ensayo se realiza sobre 1 blanco (agua de mar natural filtrada por 0,22  $\mu\text{m}$  o sintética), y 4 concentraciones de ensayo diluidas con agua de mar natural filtrada (0,22  $\mu\text{m}$ ) o sintética.
- Se realizarán 3 réplicas para cada concentración de ensayo.
- El punto final del ensayo es el porcentaje de larvas pluteus normales o el crecimiento para cada tratamiento, resultando también necesario el cálculo de la CE50 al término de la exposición.
- Los resultados del bioensayo se expresan como mg Cu/l.
- Se ha estimado una CE50 para este ensayo con *Paracentrotus lividus* de exposición al cobre de 0,051-0,087 mg/l. Para que el ensayo se considere válido, el valor de CE50 obtenido ha de estar incluido en este rango de concentraciones, permitiéndose un coeficiente de variación sobre estos valores inferior al 30% (CV<30%).
- Si un valor de CE50 se encuentra fuera del rango establecido, la sensibilidad de los organismos de ensayo y el desarrollo y precisión del mismo estarían bajo sospecha. En tal caso, se recomienda repetir el ensayo de referencia u obtener un nuevo lote de organismos para evaluar la ecotoxicidad de las muestras.
- Una vez se disponga de datos suficientes, se elaborará un diagrama histórico con los valores de CE50 obtenidos en los ensayos de referencia, con objeto de determinar si los resultados están dentro de  $\pm 2$  DS de los valores obtenidos en anteriores ensayos usando cloruro de cadmio.

En el diagrama histórico vendrán representados el logaritmo de la concentración en ordenadas (valor medio  $\pm 2$  DS), frente al número o día de ensayo en abscisas. Cada nueva CE50 para el compuesto de referencia deberá compararse con los límites históricos establecidos; la CE50 será aceptable si se encuentra entre de dichos límites. Todos los cálculos de media y desviación estándar deberán hacerse en base al  $\log(\text{CE50})$ .

- Si un valor de CE50 se encuentra fuera de los límites históricos establecidos, la sensibilidad de los organismos de ensayo y el desarrollo y precisión del mismo estarán bajo sospecha. En tal caso, se recomienda repetir el ensayo de referencia u obtener un nuevo lote de organismos para evaluar la ecotoxicidad de las muestras.
- Valores extremadamente variables para un compuesto de referencia llevarán al establecimiento de límites históricos anchos; así un nuevo punto puede encontrarse

dentro de los límites históricos y representar una alta variación en los resultados. Así pues, se recomienda un coeficiente de variación inferior al 30% como límite razonable.

## 6. Análisis e interpretación de resultados

- Los resultados del experimento control deberán usarse como criterio para juzgar la validez y aceptabilidad del ensayo. Así, el número de larvas pluteus normales en el control (las 3 réplicas) deberá ser al menos del 85% para que el ensayo se considere válido.
- Se considerará que la muestra de sedimento presenta toxicidad positiva si el número de larvas pluteus normales (los cuatro brazos claramente diferenciados o longitud superior a 300 µm en caso de optarse por el crecimiento larvario) es inferior al 70% del detectado en el control.

## 7. Presentación de resultados

Para cada bioensayo realizado se elaborará un informe que contenga la siguiente información:

1. *Material de ensayo*: breve descripción del tipo de muestra; información sobre la etiqueta de cada muestra; fecha de muestreo y llegada de la muestra al laboratorio.
2. *Organismos de ensayo*: especie, origen, fecha de recogida; cualquier comportamiento anómalo de los organismos antes de su uso.
3. *Instalaciones*: nombre y dirección del laboratorio y nombre de la persona que lleva a cabo el ensayo.
4. *Agua de ensayo*: tipo, origen y salinidad del agua de ensayo al comienzo del mismo.
5. *Metodología de ensayo*: referencias de la metodología aplicada (frecuencias de mediciones y observaciones, métodos estadísticos).
6. *Condiciones de ensayo y procedimientos*: descripción de cualquier variación introducida sobre el presente procedimiento; número de réplicas por muestra; fechas de comienzo y término del ensayo; medidas realizadas de temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, amonio no iónico, nitritos y pH del agua.

7. Resultados de los ensayos: porcentaje de éxito en la embriogénesis en cada ensayo (incluyendo el control). Conclusión de ECOTOXICIDAD o NO ECOTOXICIDAD para cada muestra. Valores de CE50 del ensayo con el tóxico de referencia expresados como mg Cu/l.

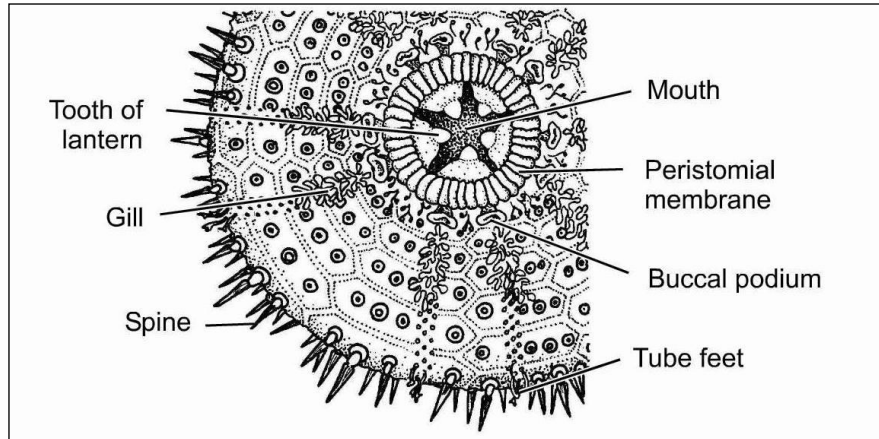


Figura 4. Estructura externa de un erizo de mar (I. Livingstone © BIODIDAC)



Figura 5. Membrana de fecundación (B) en *P. lividus* <sup>(1)</sup>

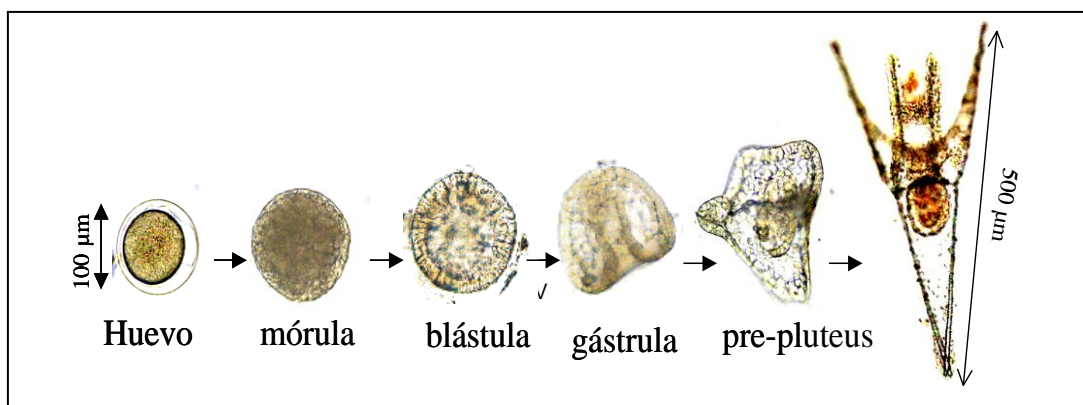


Figura 6. Desarrollo embrionario de erizo de mar hasta la larva pluteus<sup>(1)</sup>

(1) Fuente: Universidad de Cádiz, 2002. *Investigación conjunta sobre la selección y puesta a punto de ensayos biológicos para la caracterización del material dragado.*

### 6.3. BIOENSAYO EN FASE LÍQUIDA BASADO EN LA FECUNDACIÓN DEL ERIZO DE MAR *Paracentrotus lividus*

El bioensayo de fecundación de erizo de mar presenta idénticos requerimientos en lo que a material, requisitos de laboratorio, especie sobre la que se lleva a cabo y recolección y mantenimiento de los ejemplares de ensayo que los especificados para el bioensayo de embriogénesis anteriormente expuesto.

#### 1. Procedimiento de ensayo

##### Determinación de las condiciones de ensayo

Las condiciones generales de conservación de las muestras, preparación de las mismas y plazos para la realización del bioensayo son idénticas a las expuestas con anterioridad para el bioensayo de embriogénesis con erizo de mar. La tabla 2 recoge un resumen de las condiciones en las que este ensayo ha de llevarse a cabo, cuyo incumplimiento implicaría la no validez del bioensayo en cuanto a la determinación de la ecotoxicidad del sedimento objeto de estudio.

<b>Tabla 2. Condiciones en las que se ha de desarrollar el bioensayo de éxito de la fecundación en <i>Paracentrotus lividus</i> con material de dragado.</b>	
<b>Parámetro</b>	<b>Condiciones</b>
Tipo de ensayo	Estático, sobre lixiviado de sedimento (250g en 1 litro)
Temperatura del medio de ensayo	18°C
Salinidad del medio de ensayo	35±1psu
Contenedores/tubos de ensayo/viales de ensayo	20 ml de capacidad, de vidrio con tapa.
Volumen del medio de ensayo	10 ml
Renovación del medio de ensayo	Ninguna
Calidad del material biológico	Los erizos de mar serán maduros y grávidos
Tamaño de los erizos de mar (diámetro de la	30-60 mm

testa)	
Número de organismos por ensayo	3 machos y 3 hembras
Número de réplicas	Un mínimo de 5, también en el control.
Número de medidas por réplica	200 huevos
Alimentación	No
Aireación del lixiviado	Durante 20 minutos antes del ensayo
Duración del ensayo	60 min de exposición del esperma, y 20 min más una vez añadidos los óvulos.
Punto final a medir	Éxito de la fecundación.
Aceptabilidad del ensayo	Éxito en la fecundación en el control $\geq 95\%$

### **Desarrollo del ensayo**

Se expone a continuación un desarrollo temporal pormenorizado del ensayo:

#### ***Día anterior al comienzo del ensayo (día -1):***

- Obtención del lixiviado (válido para sedimentos problema y control):
  - Se homogeneiza la muestra de sedimento mediante una cuchara o espátula de teflón.
  - Se depositan en un frasco de agitación 250 g de sedimento a los que se añade 1 l de agua de mar natural filtrada (0,22  $\mu\text{m}$ ) o sintética en una proporción de 1:4 (m/m, sedimento:agua). Se elegirá el tamaño del frasco de manera que quede lo más lleno posible y la capa superior de aire sea tal que se minimice la pérdida de sustancias volátiles durante el proceso de elutriación. Se procede a tapar el frasco.
  - La mezcla así preparada se somete a agitación rotatoria (50 rpm) a temperatura ambiente ( $20\pm 2^\circ\text{C}$ ) durante 30 min.
  - Transcurrido este tiempo, se deja decantar el sedimento contenido en los frascos cerrados durante al menos 12 h en condiciones de oscuridad y a  $4^\circ\text{C}$ .

- Transcurrido este tiempo, se extrae el sobrenadante de la mezcla. La extracción del sobrenadante se hará por succión, extrayéndose 500 ml del volumen superficial de la mezcla, con los que se realizará la totalidad del ensayo. lixiviados.
  - El lixiviado debe utilizarse tan pronto sea posible; y en todo caso, se almacenará, a 4°C y en condiciones de oscuridad, por un tiempo máximo de 24h. Transcurrido este tiempo, deberá ser descartado.
  - Previo a su empleo en el ensayo se procede a la aireación del lixiviado durante 20 minutos mediante un agitador magnético con la mínima agitación necesaria. Se pretende así evitar la pérdida de compuestos químicos volátiles de la solución, o aumentar su tasa de oxidación y degradación a otras sustancias.
  - En caso de no estar disponibles sedimentos de características similares a las de los materiales a ensayar y exentos de contaminación de forma contrastada, se utilizará como control el agua utilizada para preparar los lixiviados.
- Se analizan mediante procedimientos estándar pH, salinidad, oxígeno disuelto y temperatura en el/los tanques de aclimatación de los erizos de mar, para garantizar el cumplimiento de las condiciones de ensayo.

#### ***Día de desarrollo del ensayo (día 0):***

- Obtención de gametos:
  - a) Estimulación, recogida y almacenamiento del esperma: se estimula la puesta de 3 adultos machos (tomados de forma aleatoria del tanque de aclimatación) mediante inyección de cloruro potásico (1,0 ml de KCl 0,5M, preparada por disolución de 3,75 g de KCl en 100 ml de agua desionizada) a través de la membrana peristomial al celoma (ver Figura 4, *Peristomial membrane*). Se deposita cada uno de los erizos en un vaso de precipitados (de vidrio, previamente limpiado con agua de mar control) colocado con su superficie aboral hacia abajo. Si transcurridos 10 minutos desde la inyección no se produce la puesta, se puede repetir una vez más la inyección de cloruro potásico. La liberación de esperma ha de producirse como máximo en la media hora posterior a la realización de la segunda inyección. A continuación se mezcla el esperma obtenido de los

3 machos para evitar variaciones en la reproducibilidad del ensayo, se recoge del fondo del recipiente y se transfiere a un tubo de ensayo que, una vez cerrado, se conserva a 4°C durante 4 h. Transcurrido este tiempo se pone en contacto con agua de mar, y se emplea en el bioensayo en los siguientes 30-120 min.

- b) Estimulación, recogida y almacenamiento de los óvulos: se estimula la puesta de 3 erizos hembra (tomados de forma aleatoria del tanque de aclimatación) de igual forma que la descrita para los erizos machos. A continuación, se deposita cada uno de los erizos en un vaso de precipitados (de 50 ml de volumen, de vidrio, previamente limpiado con agua de mar) colocado con su superficie aboral hacia abajo. Seguidamente, se llena hasta el borde con agua de mar a temperatura ambiente. Una vez terminada la puesta, se separa tanta agua de los gametos como sea posible. Los óvulos recogidos se lavan 3 veces diluyéndolos con 100 ml de agua de mar, se mezclan, se dejan reposar 10 min, y se decantan (los óvulos dañados tienden a flotar). Finalmente, se mezclan los óvulos obtenidos de las 3 hembras en un vaso de precipitados de vidrio de mayor tamaño para evitar variaciones en la reproducibilidad del ensayo. Los óvulos pueden mantenerse en la última dilución de agua de mar durante 4 horas hasta su empleo. Se recomienda que se aireen suavemente durante este tiempo.
- c) La recogida de gametos masculinos y femeninos ha de terminar en los 15 minutos posteriores al comienzo de la puesta. De no ser así, deberá repetirse el proceso de estimulación y recogida de gametos con nuevos individuos.
- Determinación de la concentración de gametos en la suspensión de esperma: se dispone 1,0 ml de ácido acético glacial en una probeta de vidrio de 10 ml, se añade 0,1 ml de la suspensión de esperma y se enrasa a 10 ml con agua de mar. Mezclar suavemente y dejar reposar uno o dos minutos para que desaparezcan las burbujas que se puedan formar. El conteo de los espermatozoides se realiza con ayuda de una cámara cuentaglóbulos y un microscopio. Se añade una gota de la mezcla a la cámara cuentaglóbulos y se deja reposar 15 minutos. A continuación se cuentan los espermatozoides presentes en los 400 cuadros centrales de la cámara. El número de espermatozoides presente en la suspensión vendrá determinado por la siguiente expresión:



$$N^{\circ} \text{ espermat} / \text{ml} = \frac{100 \cdot (n^{\circ} \text{ espermat contados}) \cdot (\text{factor conversión cámara}) \cdot 1000}{400}$$

El factor de conversión de una cámara cuentaglobulos Neubauer es 4.000.

- Preparación de la suspensión de espermatozoides:

Con objeto de lograr una buena reproducibilidad, se ajusta el ratio espermatozoides:óvulos a 20.000:1, y el número de óvulos a 1.000.

El volumen inicial de ensayo es 10 ml de lixiviado de sedimento (preacondicionado a la temperatura de ensayo), a los que se añade 0,1 ml de suspensión de espermatozoides y 1,0 ml de suspensión de óvulos.

Teniendo en cuenta las cifras expuestas se necesitará una densidad de espermatozoides en la suspensión de  $2 \times 10^8$  espermatozoides/ml que puede alcanzarse diluyendo con agua de mar filtrada por 0,22 µm o sintética o bien concentrando la solución, según corresponda.

- Exposición del esperma:

Se toma un volumen de 0,1 ml de la suspensión de espermatozoides ajustado a las características expuestas y se añade a 10 ml de lixiviado de sedimento contenidos en un recipiente de vidrio con la ayuda de una micropipeta dispensadora. La adición se realiza al centro del recipiente y sin que la punta de la pipeta entre en contacto con el lixiviado. Se agita suavemente y se incuba en un baño termostático a 18°C durante 60 min.

- Preparación de la suspensión de óvulos:

La densidad de la suspensión de óvulos se ajusta a 1.000 óvulos/ml. Para ello, durante la incubación de los espermatozoides, se determina la densidad de la suspensión inicial de óvulos por conteo de 1,0 ml con ayuda de una cámara de conteo de plancton. Una vez conocida la concentración inicial de óvulos, se alcanza la concentración de óvulos deseada

de 1.000 óvulos/ml, bien diluyendo (añadiendo agua de mar filtrada por 0,22 µm) o bien concentrando (dejando sedimentar los óvulos y decantando el agua) la solución, según corresponda.

- Exposición de los óvulos:

Transcurridos los 60 minutos de exposición de los espermatozoides al lixiviado se añade 1,0 ml de la solución de óvulos (preacondicionada a 18°C y mezclada) al centro del recipiente y sin que la punta de la pipeta entre en contacto con el lixiviado. Se agita suavemente y se deja transcurrir un tiempo de 20 minutos para asegurar que se produce la fecundación. Los óvulos se añaden a los recipientes en el mismo orden que los espermatozoides, y con la misma diferencia de tiempo entre adición y adición para cada uno de los recipientes (5 segundos).

- Finalización del ensayo:

Transcurridos los 20 minutos de exposición se concluye el ensayo añadiendo 2 ml de formalina buffer al 10% <sup>6</sup>. Los huevos pueden mantenerse almacenados en estas condiciones, en recipientes sellados hasta 3 días antes de proceder a su conteo.

## **2. Punto final del ensayo y tratamiento de datos**

- El punto final a medir en este ensayo es el éxito en la fecundación de los huevos.
- Si se dispone de un microscopio invertido y contenedores adecuados se procede directamente al conteo de huevos una vez concluido el tiempo de exposición. Esto es lo más recomendable para reducir la manipulación de la muestra. En caso contrario, se extraen los huevos de cada uno de los recipientes que los contiene. Con objeto de tomar una muestra representativa de los huevos se pipetea y descarta la mayor cantidad posible del sobrenadante para concentrar así la suspensión de huevos. A continuación se mezcla la suspensión restante y se extrae la muestra para su conteo.

---

<sup>6</sup> La solución se prepara añadiendo a 900 ml de agua destilada, 100 g de formalina, 4 g de fosfato de sodio monobásico y 6,5 g de fosfato de sodio dibásico anhidro. La formalina es una sustancia peligrosa por lo que debe manejarse en condiciones de seguridad apropiadas y el conteo de los huevos ha de hacerse en un lugar ventilado. La solución ha de mantenerse en un área independiente a aquella dónde se alojan y manipulan los organismos.

- Se cuentan 200 huevos por muestra y se clasifican como fecundados o no fecundados con la ayuda del microscopio (ver Figura 5).
- El criterio de fecundación lo determina la aparición de la membrana de fecundación, lo que incluye membranas completas y parciales, puesto que no aparecen en huevos que no han sido fecundados. Aquellos huevos que presenten una clara anomalía o estén muertos (floten) serán descartados independientemente de que estén fecundados o no.
- El ensayo se considera válido cuando la tasa de fecundación en el control (todas las réplicas) está comprendida entre el 95 y el 100%.

### **3. Procedimiento para el ensayo del compuesto tóxico de referencia**

- Este ensayo habrá de realizarse una vez al mes, en los meses en los que se realice el ensayo.
- El ensayo se desarrollará, siempre que sea posible, simultáneamente al ensayo de ecotoxicidad del lixiviado de sedimento.
- A menos que se indique lo contrario, todas las condiciones y procedimientos para preparar y llevar a cabo el ensayo serán idénticas a las ya descritas en el presente protocolo. El criterio de aceptación del ensayo también se mantiene.
- El ensayo se realiza sobre una solución del tóxico de referencia, en lugar de sobre lixiviado de sedimento.
- El tóxico de referencia a emplear es una solución estándar de absorción atómica de cobre:  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \times 3\text{H}_2\text{O}$  (1.000 mg/l).
- La solución estándar se diluye (1:1.000) añadiendo agua bidestilada.
- El ensayo se realiza sobre 1 blanco (agua de mar natural filtrada por 0,22  $\mu\text{m}$  o sintética, y 4 concentraciones de ensayo diluidas con agua de mar natural filtrada (0,22  $\mu\text{m}$ ) o sintética.
- Se realizarán 3 réplicas para cada concentración de ensayo.
- El punto final del ensayo es el porcentaje de fecundación para cada tratamiento, debiéndose determinar también la CE50 al término de la exposición.
- Los resultados del bioensayo se expresan como mg Cu/l
- Se ha estimado una CE50 para este ensayo con *Paracentrotus lividus* de exposición al cobre de 0,055 mg/l con una desviación estándar de 0,0081 (CE50=0,055 mg/l  $\pm$  0,0081). Para que el ensayo se considere válido, el valor de CE50 obtenido ha de estar

incluido en este rango de concentraciones, permitiéndose un coeficiente de variación sobre estos valores inferior al 30% ( $CV < 30\%$ ).

- Si un valor de CE50 se encuentra fuera del rango establecido, la sensibilidad de los organismos de ensayo y el desarrollo y precisión del mismo estarían bajo sospecha. En tal caso, se recomienda repetir el ensayo de referencia u obtener un nuevo lote de organismos para evaluar la ecotoxicidad de las muestras.
- Una vez se disponga de datos suficientes, se elaborará un diagrama histórico con los valores de CE50 obtenidos en los ensayos de referencia, con objeto de determinar si los resultados están dentro de  $\pm 2$  DS de los valores obtenidos en anteriores ensayos usando cloruro de cadmio.
- En el diagrama histórico vendrán representados el logaritmo de la concentración en ordenadas (valor medio  $\pm 2$  DS), frente al número o día de ensayo en abscisas. Cada nueva CE50 para el compuesto de referencia deberá compararse con los límites históricos establecidos; la CE50 será aceptable si se encuentra entre de dichos límites. Todos los cálculos de media y desviación estándar deberán hacerse en base al  $\log(CE50)$ .
- Si un valor de CE50 se encuentra fuera de los límites históricos establecidos, la sensibilidad de los organismos de ensayo y el desarrollo y precisión del mismo estarán bajo sospecha. En tal caso, se recomienda repetir el ensayo de referencia u obtener un nuevo lote de organismos para evaluar la ecotoxicidad de las muestras.
- Valores extremadamente variables para un compuesto de referencia llevarán al establecimiento de límites históricos anchos; así un nuevo punto puede encontrarse dentro de los límites históricos y representar una alta variación en los resultados. Así pues, se recomienda un coeficiente de variación inferior al 30% como límite razonable.

#### **4. Análisis e interpretación de resultados**

- Los resultados del experimento control deberán usarse como criterio para juzgar la validez y aceptabilidad del ensayo. Así, la tasa de fecundación en el control (las 3 réplicas) habrá de estar comprendida entre el 95 y el 100% para que el ensayo se considere válido.
- Se considerará que la muestra de sedimento presenta toxicidad positiva si la inhibición de la fecundación que produce es superior al 30% del detectado en la muestra control (tasa de fecundación observada inferior o igual al 70%).

#### **5. Presentación de resultados**

Para cada bioensayo realizado se elaborará un informe que contenga la siguiente información:

1. *Material de ensayo*: breve descripción del tipo de muestra; información sobre la etiqueta de cada muestra; fecha de muestreo y llegada de la muestra al laboratorio.
2. *Organismos de ensayo*: especie, origen, fecha de recogida; cualquier comportamiento anómalo de los organismos antes de su uso.
3. *Instalaciones*: nombre y dirección del laboratorio y nombre de la persona que lleva a cabo el ensayo.
4. *Agua de ensayo*: tipo, origen y salinidad del agua de ensayo al comienzo del mismo.
5. *Metodología de ensayo*: referencias de la metodología aplicada (frecuencias de mediciones y observaciones).
6. *Condiciones de ensayo y procedimientos*: descripción de cualquier variación introducida sobre el presente procedimiento; número de réplicas por muestra; fechas de comienzo y término del ensayo; medidas realizadas de temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, amonio no iónico, nitritos y pH del agua.
7. *Resultados de los ensayos*: porcentaje del éxito de fecundación en cada ensayo (incluyendo el control). Conclusión de ECOTOXICIDAD o NO ECOTOXICIDAD para cada muestra. Valores de CE50 del ensayo con el tóxico de referencia expresados como mg Cu/l.

## 6.4. BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA EN FASE SÓLIDA CON ANFÍPODOS

### 1. Introducción

Los anfípodos son pequeños crustáceos malacostráceos que se emplean de forma habitual en ensayos de ecotoxicidad sobre sedimentos marinos y estuarinos y en material a dragar (Swartz et al., 1985; DeWitt et al., 1989; Scout & Redmond, 1989; DeWitt et al., 1992).

El ensayo de ecotoxicidad de sedimentos con anfípodos es simple, de un coste relativamente bajo y emplea individuos sensibles a la presencia de diversos contaminantes habituales en el material de dragado (Craymeersch et al., 2000; Collier & Pinn, 1998) como bioindicadores de ecotoxicidad. Su aplicación está ampliamente distribuida y recomendada en la reglamentación mundial del material de dragado (USEPA, 1991; Environment Canada, 1992; Environment Australia, 2002; OSPAR, 2004; RIKZ, 2004), disponiéndose actualmente de información que garantiza su sensibilidad y viabilidad gracias a ejercicios de intercalibración llevados a cabo entre diversos laboratorios de reconocido prestigio (BEQUALM, 2006; Bay et al., 2003; Hiscock et al., 2004). Además, existen estudios que analizan indicadores de ecotoxicidad subletales basados en el crecimiento (Scartett et al., 2007).

El presente protocolo se fundamenta en las referencias bibliográficas expuestas al final del documento.

### 2. Equipo y material necesarios

#### Material

- Anfípodos: *Ampelisca brevicornis* (3-5 mm) o *Corophium sp* (4-10 mm).
- Sedimento problema.
- Sedimento control de un área libre de contaminación (preferiblemente el área de recolección de los anfípodos).
- Cloruro de cadmio, CdCl<sub>2</sub> referencia de un área contaminada.

- Agua de mar natural filtrada (30  $\mu\text{m}$ ) o sintética (de uso en acuariofilia).
- Agua destilada.
- Balanza analítica de 0,01 g de precisión.
- Lupa binocular.
- Botes de vidrio cilíndricos de aproximadamente 1,5 l de capacidad con tapa.
- Cámara con control de temperatura.
- Cuchara o espátula de teflón para la homogeneización de la muestra.
- Guantes de látex.
- Pipetas de 1 y 10 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Sistema regulador de la intensidad y duración del fotoperiodo.
- Sistema de aireación (ver tabla 3).
- Sonda multiparamétrica o similar para la determinación del pH, oxígeno disuelto, amonio, temperatura y salinidad.
- Tamices de acero inoxidable o nailon de 500 y 1000  $\mu\text{m}$  de luz de malla.

### **Requerimientos mínimos de laboratorio**

El lugar de trabajo donde se desarrolle el bioensayo cumplirá con la normativa nacional existente en materia de seguridad laboral prestándose especial atención al cumplimiento de las Normas Técnicas de Prevención elaboradas por el Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

Todo equipo o recipiente que vaya a entrar en contacto con el sedimento, el agua sobrenadante o los organismos de ensayo habrá de ser limpiado correctamente antes de su uso.

### **3. Organismos de ensayo**

#### **Especie**

El presente protocolo de ensayo es válido para las especies de anfípodos: *Ampelisca brevicornis* y *Corophium sp.* Las condiciones de recolección, mantenimiento de los organismos y desarrollo del ensayo serán las mismas para ambas especies, salvo que se indique de forma expresa.

#### **Recolección y mantenimiento**

- *Recolección de animales:*

El número de organismos a recolectar será tal que permita llevar a cabo tanto los ensayos de las muestras problema, como la del control y tóxico positivo de referencia con el mismo lote de organismos. La recolección de animales tendrá lugar en una zona intermareal limpia (fango o arena fangosa). Los animales se recogerán de los 5 cm más superficiales del sedimento con una espátula, tamizándolos (500  $\mu\text{m}$ ) y depositándolos suavemente en contenedores con tapa, donde previamente se habrá depositado una capa  $\geq 2\text{cm}$  de sedimento. La densidad adecuada de los anfípodos por contenedor será aproximadamente de 1 ejemplar/ $\text{cm}^2$ . Los contenedores se llevarán al laboratorio tan pronto sea posible.

- *Condiciones de mantenimiento y aclimatación:*

Los animales deberán aclimatarse (7-10 días) a las condiciones de luz, temperatura y salinidad que se aplicarán durante el ensayo (ver tabla 3). La temperatura de la capa de agua sobrenadante se ajustará de forma gradual, no pudiendo variar más de 3°C por día; análogamente, se ajustará la salinidad, no pudiéndose variar más de 5 psu por día.

Los anfípodos se mantendrán, sin recibir alimento, en los contenedores de vidrio empleados para su transporte, salvo que el número de individuos por contenedor sea elevado (más de 1 anfípodo/ $\text{cm}^2$ ), en cuyo caso la muestra será transferida (sin tamizar) a un contenedor de mayor tamaño. El espesor de sedimento en los contenedores será de entre 2 y 4 cm y el espesor de la capa de agua sobrenadante de al menos 5 cm. El agua sobrenadante se



cambiará diariamente por agua de mar fresca natural o sintética, manteniéndose en todo momento un contenido en oxígeno disuelto superior o igual al 90% de saturación, aplicándose aireación en caso necesario.

La temperatura, pH, salinidad y oxígeno disuelto se medirán a diario siguiendo protocolos estándar. La mortalidad registrada en la etapa de mantenimiento tiene que ser inferior al 10% para poder llevar a cabo el bioensayo.

Deberá descartarse todo animal que no se entierre o cuyo aspecto o comportamiento sea atípico.

#### **4. Procedimiento de ensayo**

##### **Recolección de la muestra**

Las muestras problema y control se recogerán y manipularán siguiendo lo indicado en el Anejo II de estas Directrices. Se mantendrán en recipientes sellados, libres de aire y debidamente etiquetados. La información a recoger en las etiquetas aparece descrita a continuación:

- Naturaleza, apariencia, volumen y/o peso de cada muestra;
- Procedimiento y aparato de muestreo;
- El número de réplicas tomadas;
- El esquema de muestreo;
- El tipo y número de contenedores empleado para el transporte de las muestras;
- Temperatura, salinidad, pH y oxígeno disuelto de la capa de agua sobrenadante del lugar de muestreo;
- Condiciones de transporte de las muestras hasta el laboratorio.

Durante el transporte, las muestras se mantendrán en oscuridad y a  $4 \pm 3^{\circ}\text{C}$  empleando hielo o paquetes de gel helado.

### **Determinación de las condiciones de ensayo**

A su llegada al laboratorio, y siempre hasta su uso, las muestras se mantendrán refrigeradas, a 4°C, nunca congeladas, libres de aire y en oscuridad. Caben para ello dos posibilidades, o bien se llenan los recipientes de ensayo en su totalidad para evitar la disponibilidad de oxígeno en su interior, o bien se purga el aire presente en el espacio libre de muestra del recipiente con gas nitrógeno. Se recomienda comenzar el bioensayo lo antes posible y, en todo caso, antes de las tres semanas posteriores a la toma de la muestra. La tabla 3 recoge un resumen de las condiciones en las que el ensayo ha de llevarse a cabo, cuyo incumplimiento implicaría la no validez del bioensayo en cuanto a la determinación de la ecotoxicidad del sedimento objeto de estudio.

<b>Tabla 3. Condiciones en las que se ha de desarrollar el bioensayo de toxicidad aguda de material de dragado sobre anfípodos</b>													
<b>Parámetro</b>	<b>Condiciones</b>												
Tipo de ensayo	Estático, sobre sedimento bruto												
Temperatura del agua sobrenadante	20±2°C <i>Ampelisca brevicornis</i> * 15±2°C <i>Corophium sp</i>												
Salinidad del agua sobrenadante	30-40 psu para <i>Ampelisca brevicornis</i> 24-36 psu para <i>Corophium sp</i>												
Iluminación	Espectro solar diurno capaz de mantener 500-1000 lux en todo momento												
pH inicial del agua sobrenadante	7,0-9,0												
Amonio del agua sobrenadante	<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">pH = 8,0: &lt;75 mg/l</td> <td style="width: 50%;">pH = 8,6: &lt;26 mg/l</td> </tr> <tr> <td>pH = 8,1: &lt;52 mg/l</td> <td>pH = 8,7: &lt;21 mg/l</td> </tr> <tr> <td>pH = 8,2: &lt;50 mg/l</td> <td>pH = 8,8: &lt;17 mg/l</td> </tr> <tr> <td>pH = 8,3: &lt;49 mg/l</td> <td>pH = 8,9: &lt;14 mg/l</td> </tr> <tr> <td>pH = 8,4: &lt;39 mg/l</td> <td>pH = 9,0: &lt;11 mg/l</td> </tr> <tr> <td>pH = 8,5: &lt;32 mg/l</td> <td></td> </tr> </table>	pH = 8,0: <75 mg/l	pH = 8,6: <26 mg/l	pH = 8,1: <52 mg/l	pH = 8,7: <21 mg/l	pH = 8,2: <50 mg/l	pH = 8,8: <17 mg/l	pH = 8,3: <49 mg/l	pH = 8,9: <14 mg/l	pH = 8,4: <39 mg/l	pH = 9,0: <11 mg/l	pH = 8,5: <32 mg/l	
pH = 8,0: <75 mg/l	pH = 8,6: <26 mg/l												
pH = 8,1: <52 mg/l	pH = 8,7: <21 mg/l												
pH = 8,2: <50 mg/l	pH = 8,8: <17 mg/l												
pH = 8,3: <49 mg/l	pH = 8,9: <14 mg/l												
pH = 8,4: <39 mg/l	pH = 9,0: <11 mg/l												
pH = 8,5: <32 mg/l													
Contenedores	1-2 l de capacidad, cilíndricos, de 10 cm de												

	diámetro interno, de vidrio, con tapa
Volumen de sedimento	175 ml (aprox. 2 cm de profundidad)
Volumen de la capa de agua sobrenadante	775 ml
Renovación del agua sobrenadante	Ninguna
Calidad del material biológico	Los anfípodos mostrarán comportamiento activo natatorio al ponerlos en contacto con el agua y exhibirán una coloración normal
Tamaño de los anfípodos (longitud total)	3-5 mm <i>Ampelisca brevicornis</i> 4-10 mm <i>Corophium sp</i>
Número de organismos por contenedor	20
Número de réplicas	Un mínimo de 5 (también en el control)
Alimentación	No
Aireación	Difusores porosos individuales de aireación o pipetas de plástico que formen burbujas. En todo caso el contenido de oxígeno disuelto será >90% en la capa de agua sobrenadante y en ningún caso se alterará el sedimento.
Agua sobrenadante	Agua de mar natural filtrada (30 µm) o sintética
Calidad del agua sobrenadante	Determinación diaria de pH, temperatura, salinidad y oxígeno disuelto. Determinación de amonio en los días 2 y 8 de ensayo
Duración del ensayo	10 días
Punto final a medir	Supervivencia
Aceptabilidad del ensayo	Supervivencia media en el control ≥ 90%. Contenido de oxígeno disuelto >60% en la capa de agua sobrenadante aún en aquellos casos en que el aporte de oxígeno sea interrumpido.
<p>* El valor de temperatura seleccionado para esta especie se corresponde con el valor cercano al máximo del intervalo térmico estival que encontraría en su medio natural, como es la costa cántabra y vasca.</p>	

**Desarrollo del ensayo**

Se expone a continuación un desarrollo temporal pormenorizado del ensayo:

***Día anterior al comienzo del ensayo (día -1):***

- Caracterización del agua intersticial:
  - Se extrae el agua intersticial de cada muestra de sedimento (problema y control) mediante una decantación natural del sedimento bruto o tras su centrifugado.
  - Se analizan mediante procedimientos estándar el pH, la salinidad y el amonio del agua de mar intersticial. Los valores estarán comprendidos en el mismo rango de tolerancia que el determinado para el agua de mar sobrenadante para cada una de las especies de anfípodos.
  
- Preparación de las muestras de sedimento:
  - Preparación de los sedimentos problema: se homogeneiza la muestra de sedimento mediante una cuchara o espátula de teflón. No se realiza tamizado en húmedo porque se retirarían los contaminantes presentes en el agua intersticial o ligeramente adsorbidos a las partículas. Con objeto de retirar los organismos que pudieran estar presentes o el material de gran tamaño se tamiza por presión el sedimento (tamiz de acero inoxidable o de nylon de 1 mm) sin añadir agua.
  - Preparación del sedimento control: se tamiza (tamiz de acero inoxidable o de nylon de 500 µm) en húmedo (empleando agua de mar de ensayo) la porción de sedimento control obtenida en el lugar de muestreo de anfípodos (o sedimento marino con ausencia contrastada de contaminación en caso de no recurrirse a recolección de anfípodos en la naturaleza).
  
- Preparación de los contenedores de ensayo:
  - Se añaden 175 ml de sedimento homogeneizado a los contenedores para formar una capa de un espesor aproximado de 2 cm.
  - Se añaden a los contenedores 775 ml agua de mar filtrada (30 µm) o sintética y se tapan para minimizar las posibles pérdidas de agua por evaporación.

- Tras esperar a que decante el sedimento se airean suavemente los contenedores con cuidado de no alterar el sedimento.
- Se mantienen los contenedores en estas condiciones durante al menos 12 h.

#### ***Día de comienzo del ensayo (día 0):***

- Se añade agua destilada a los contenedores de ensayo preparados el día anterior hasta volver a alcanzar el volumen total de 950 ml, logrando así diluir el agua de mar y devolverla a su salinidad inicial, ya que la aireación constante provoca cierta evaporación. Se recomienda marcar el nivel de agua de mar en el tanque el día 0 y en caso necesario rellenar cada día hasta la marca con agua destilada.
- Extracción de los organismos del contenedor de aclimatación: se utiliza para ello un tamiz (500  $\mu\text{m}$ ) hasta obtener, aproximadamente, un tercio más de los organismos necesarios para llevar a cabo el ensayo. El tamizado se llevará a cabo con agua de las mismas características que la del contenedor de aclimatación.
- Se trasladan los organismos de forma aleatoria y en número de 20 a los contenedores de ensayo. La aireación se detiene durante el proceso de adición de los organismos.
- Se tapan los contenedores y una hora después se reanuda la aireación, que se mantendrá durante los diez días de duración del ensayo salvo en los momentos de medición de los parámetros fisicoquímicos requeridos.
- Durante la primera hora de ensayo se ha de observar detenidamente el comportamiento de los organismos. Aquellos anfípodos que durante ese tiempo no se hayan enterrado serán reemplazados por otros procedentes del mismo tamizado a menos que de forma repetida se entierren y reaparezcan inmediatamente. Se registra el número de organismos reemplazados.

#### ***Día 1 a 9 de ensayo:***

- Se mide la temperatura, el pH, el amonio (días 2 y 8), la salinidad y el oxígeno disuelto del agua sobrenadante. Se recomienda medir el oxígeno disuelto, pH y salinidad mediante electrodos y medidores calibrados. La determinación de amonio se hará extrayendo una alícuota de la capa de agua sobrenadante (siempre menor del 10% del volumen total) para el análisis. El agua se tomará mediante una pipeta colocada a 1-2 cm por encima de la superficie del sedimento. Se repondrá la cantidad de agua extraída con agua de mar. El agua de mar empleada en la reposición será de las mismas características que la inicialmente empleada para el llenado de los contenedores.

- Se tomará nota de los animales que nadan en el agua o que floten en su superficie o emerjan aparentemente muertos. Los organismos atrapados en la interfase aire-agua serán empujados suavemente al fondo mediante una pipeta. Los organismos que parezcan estar muertos no se retirarán.

#### **Día 10 de ensayo: finaliza el ensayo.**

- Se registra el número de organismos que flota en la superficie del agua sobrenadante, que nadan en ella, que se mueven por la superficie del sedimento y que emergen de él, aparentemente muertos. Antes de tamizar la muestra, se retiran todos los anfípodos que estén en la columna de agua o en la superficie del sedimento. Aquellos individuos que no muestren actividad, pero cuya muerte no resulte evidente (no existe descomposición) serán pinchados suavemente bajo una lupa para asegurar que no manifiestan signo alguno de vida (movimiento neuromuscular del pleópodo o de las antenas).
- Se tamiza el sedimento con una malla metálica o de nylon de 500  $\mu\text{m}$  y empleando agua de ensayo. El material retenido en la malla será lavado con agua de ensayo limpia. Los organismos se irán retirando a medida que vayan apareciendo y la forma de discernir si están vivos o muertos será la anteriormente expuesta. Los animales que no aparezcan serán contabilizados como muertos al asumirse que murieron y se desintegraron en el transcurso del ensayo.

#### **5. Punto final del ensayo y tratamiento de datos**

- El punto final a medir en este ensayo es la supervivencia.
- El porcentaje medio de supervivencia de anfípodos que sobreviven al cabo de los 10 días de exposición se calcula para cada grupo de réplicas que representan una muestra de sedimento.
- Cuando se dé la circunstancia de que la mortalidad de anfípodos registrada en 1 de las 5 réplicas realizadas para el análisis de una muestra discrepe de forma considerable de las otras 4 réplicas, esta puede llegar a eliminarse del cálculo del porcentaje medio de supervivencia de anfípodos del bioensayo. Para ello se calcula, por un lado, el porcentaje medio de supervivencia de anfípodos con las 5 réplicas, y por otro, el porcentaje medio de supervivencia de anfípodos con las 4 réplicas (desestimando la réplica cuyo valor discrepa considerablemente del resto de las réplicas). Si la diferencia entre ambos porcentajes es superior al 5% se eliminará la réplica discordante y el porcentaje medio de supervivencia de anfípodos para el bioensayo será el calculado con las 4 réplicas de la muestra de sedimento restantes. En todo caso se podrá eliminar a

efectos del cálculo del porcentaje medio de supervivencia de anfípodos del bioensayo una, y sólo una, de las 5 réplicas ensayadas.

## **6. Procedimiento para el ensayo del compuesto tóxico de referencia**

- Este ensayo habrá de realizarse con cada lote de anfípodos recolectado.
- Se trata de un ensayo estático de 96 h de duración que emplea cloruro de cadmio de calidad reactivo.
- El ensayo comienza el mismo día que el ensayo de ecotoxicidad del sedimento.
- Se necesitan como mínimo 1 blanco y 5 concentraciones de cadmio en agua por cada tratamiento.
- A menos que se indique lo contrario, todas las condiciones y procedimientos para preparar y llevar a cabo el ensayo serán idénticas a las ya descritas en el presente protocolo. Se realizarán 3 réplicas para cada concentración de ensayo.
- El ensayo se desarrolla sobre un mínimo de 10 anfípodos por cámara de ensayo.
- El sedimento a emplear en este ensayo será el mismo que el utilizado en la muestra control del ensayo de la muestra problema.
- El ensayo se desarrolla en oscuridad y con aireación.
- Las concentraciones seleccionadas para el ensayo de referencia habrán de producir mortalidades parciales en dos o más concentraciones y permitir el cálculo de una CE50 a las 96 h con unos límites de confianza del 95% aceptablemente estrechos.
- Se han estimado unos valores de CE50 a las 96 h para *Ampelisca sp.* expuesto a cadmio de 0,55 mg/l (ASTM, 2003) y para *Corophium sp.* de 0,93 mg/l (USEPA, 2001). Para que el ensayo se considere válido se podrá aceptar un coeficiente de variación sobre estos valores inferior al 30% (CV<30%).
- El agua de ensayo será aireada hasta alcanzar un contenido en oxígeno superior o igual al 90% de saturación y su temperatura ajustada a los requerimientos de cada especie.
- La temperatura del agua en cada contenedor se medirá diariamente.
- Oxígeno disuelto, salinidad y pH se medirán al principio y final de cada ensayo.
- Al término de las 96 h de exposición, se cuentan el número de anfípodos vivos y muertos.

- El punto final del ensayo es el porcentaje de supervivencia para cada tratamiento y la CE50 a las 96 h.
- Los resultados se expresan en mg Cd/l, considerándose válidos y aceptables si la supervivencia en el control a las 96 h es superior o igual al 90%.
- Una vez se disponga de datos suficientes, se elaborará un diagrama histórico con los valores de CE50 obtenidos en los ensayos de referencia, con objeto de determinar si los resultados están dentro de  $\pm 2$  DS de los valores obtenidos en anteriores ensayos usando cloruro de cadmio.
- En el diagrama histórico vendrán representados el logaritmo de la concentración en ordenadas (valor medio  $\pm 2$  DS), frente al número o día de ensayo en abscisas. Cada nueva CE50 para el compuesto de referencia deberá compararse con los límites históricos establecidos; la CE50 será aceptable si se encuentra entre dentro de dichos límites. Todos los cálculos de media y desviación estándar deberán hacerse en base al  $\log(\text{CE50})$ .
- Si un valor de CE50 se encuentra fuera de los límites históricos establecidos, la sensibilidad de los organismos de ensayo y el desarrollo y precisión del mismo estarán bajo sospecha. En tal caso, se recomienda repetir el ensayo de referencia u obtener un nuevo lote de organismos para evaluar la ecotoxicidad de las muestras.
- Valores extremadamente variables para un compuesto de referencia llevarán al establecimiento de límites históricos amplios; así un nuevo punto puede encontrarse dentro de los límites históricos y representar una alta variación en los resultados. Así pues, se recomienda un coeficiente de variación inferior al 30% como límite razonable.

## **7. Análisis e interpretación de resultados**

- El personal que desarrolle el ensayo habrá de demostrar que es capaz de recuperar una media de al menos el 90% de los organismos presentes en el sedimento control. Para ello se pueden añadir organismos al sedimento control y recuperarlos 1 h después (Tomasovic et al., 1995).
- Los resultados del experimento control deberán usarse como criterio para juzgar la validez y aceptabilidad del ensayo: la supervivencia media en el control tiene que ser igual o superior al 90% para que el ensayo se considere válido.
- Se considerará que la muestra de sedimento presenta toxicidad positiva si la supervivencia es inferior al 70% de la detectada en la muestra control.

## **8. Presentación de resultados**



Se elaborará un informe para cada bioensayo realizado, que contenga los puntos expuestos a continuación:

1. *Material de ensayo*: breve descripción del tipo de muestra; información sobre la etiqueta de cada muestra; fecha de muestreo y llegada de la muestra al laboratorio.
2. *Organismos de ensayo*: especie, origen, fecha de recogida; cualquier comportamiento anómalo de los organismos antes de su uso.
3. *Instalaciones*: nombre y dirección del laboratorio y nombre de la persona que lleva a cabo el ensayo.
4. *Agua de ensayo*: tipo, origen y salinidad del agua de ensayo al comienzo del mismo.
5. *Metodología de ensayo*: referencias de la metodología aplicada (frecuencias de mediciones y observaciones, etc.).
6. *Condiciones de ensayo y procedimientos*: descripción de cualquier variación introducida sobre el presente procedimiento; número de réplicas por muestra; volumen de sedimento y de capa de agua sobrenadante en cada contenedor; número de organismos por contenedor; fechas de comienzo y término del ensayo; todas las medidas de temperatura, oxígeno disuelto, salinidad, amonio y pH del agua sobrenadante para al menos una réplica por ensayo; toda medida inferior al 60% de oxígeno disuelto registrada en el agua sobrenadante.
7. *Resultados de los ensayos*: porcentaje medio de anfípodos que sobrevivieron en cada tratamiento (incluyendo control) durante los 10 días de ensayo. Conclusión de ECOTOXICIDAD o NO ECOTOXICIDAD para cada muestra. Valores de CE50 del ensayo de 96 h con cloruro de cadmio (incluyendo los límites de confianza al 95%) expresados como mg Cd/l, junto con el valor medio geométrico ( $\pm 2$  DS) si se hubiera hecho este ensayo con anterioridad en las instalaciones.

## **ANEJO V: MEDIDAS PREVENTIVAS Y USO DE LAS MEJORES PRÁCTICAS AMBIENTALES**

### **1. MEDIDAS PREVENTIVAS Y DE MITIGACIÓN DE LOS EFECTOS NEGATIVOS DE LAS OPERACIONES DE DRAGADO DE LOS MATERIALES**

1. Las medidas de prevención y mitigación serán definidas en las etapas iniciales del proyecto, de manera que puedan ser tenidas en consideración en la evaluación de alternativas. Deberá establecerse, con el suficiente grado de detalle:

- El tipo de medida a establecer
- Las variables del medio sobre la que se pretende actuar y los resultados esperables
- Los parámetros que determinarán su establecimiento y el umbral para los mismos
- Su extensión espacial y/o temporal

2. Las medidas de prevención y mitigación a considerar en los proyectos de dragado serán:

- De carácter general o estratégico:
  - Control operacional de los equipos de dragado.
  - Selección de los equipos de dragado y calendario de las operaciones adecuado, de manera que se minimicen los impactos espaciotemporales sobre las comunidades de bentos y necton (y sus fases planctónicas), atendiendo a sus ciclos de vida.
  - Selección de equipos de dragado dotados de tecnología antiturbidez (ecodragas).
  - En caso de dragas de succión en marcha, ajuste de los rumbos de la draga para que al final del llenado (máximas pérdidas por lavado), se encuentre lo más alejada posible de las posibles zonas a proteger.
  - Diseño adecuado de la orientación, forma y dimensiones finales de las zanjas de dragado, para evitar la formación de canales preferenciales que puedan modificar sustancialmente la dinámica sedimentaria.

- Específicas de cada proyecto:
  - En zonas sensibles o muy cercanas a ellas: uso de sistemas de dragado de alta precisión y que reduzcan la resuspensión del material (p. ej. mediante tecnología de recirculación del agua de dragado). Empleo de cortinas antiturbidez que impidan el paso de sedimentos en suspensión hacia las zonas aledañas sensibles.
  - Zona con intensas corrientes mareales: realización de las labores de dragado coincidiendo con periodos de mareas muertas para limitar el área de afección influenciada por la resedimentación del material suspendido.
  - Zonas con caladeros cercanos: zonificación del área para programar las operaciones de dragado de manera que las pesquerías más sensibles queden protegidas y se posibilite el acceso de las embarcaciones a sus caladeros tradicionales.
  - Zonas de interés arqueológico: realización de una prospección subacuática superficial mediante métodos directos (buceadores), o métodos indirectos (filmación submarina georeferenciada, sonda multihaz, sonar de barrido lateral, sondas interferométricas), y una prospección subacuática profunda si se va a extraer una capa importante de sedimentos (perfiladores acústicos y magnetométricos). Seguimiento de las actuaciones por personal especializado para evitar posibles afecciones sobre el patrimonio arqueológico.
  - Proyectos que requieren especial protección del entorno: empleo de sistemas que incorporan los “últimos desarrollos en sistemas de dragado menos impactantes”.
  - Proyectos a ejecutar en zonas de escaso hidrodinamismo: empleo de pantallas antiturbidez o pantallas de burbujas (*antiturbidity bubble air wall*).

## **2. MEJORES PRÁCTICAS AMBIENTALES PARA EL DRAGADO DE LOS MATERIALES**

1. Las operaciones de dragado se deberán planificar y controlar adecuadamente con el objeto de minimizar sus efectos en el medio marino. Durante el desarrollo de estas operaciones se aplicarán las mejores prácticas ambientales para minimizar los impactos del dragado, mejorar la calidad del sedimento y optimizar las cantidades vertidas.

2. De cara a minimizar los impactos del dragado se podrá disminuir el incremento de turbidez utilizando equipos de excavación y cabezales de dragado dotados de recirculación de agua, mediante el empleo de pantallas antiturbidez, reduciendo el *overflow* o rebose en

caso de dragas de succión, usando dragas especialmente diseñadas para el dragado de sedimentos contaminados o evitando la utilización de dragas que introduzcan grandes cantidades de sedimentos en suspensión en la columna de agua. La disminución de oxígeno disuelto en la columna de agua podrá conseguirse evitando realizar el dragado en periodos de temperaturas elevadas.

3. La mejora de la calidad del material a dragar o verter al mar se podrá realizar in situ antes del dragado mejorando los aspectos físicos del material dragado (cohesión, consistencia y densidad) mediante la utilización de medios físicos como la vibración para el incremento de la densidad de los sedimentos, y/o en la cántara de la draga mediante la separación mecánica (hidrociclones para la separación de las fracciones granulométricas, flotación, floculación y desecación).

4. La optimización de las cantidades vertidas se llevará a cabo dragando el mínimo volumen de material y mejorando el proceso de dragado.

- Para dragar el mínimo volumen de material se deberán optimizar las necesidades de dragado (dragando solamente la cantidad de material requerido para la navegación, dragando estructuras arenosas móviles, utilizando estructuras hidráulicas para reducir la sedimentación y vigilancia precisa de las profundidades dragadas con una frecuencia adecuada) y optimizando la gestión de las operaciones de dragado (utilización de sistemas de reconocimiento y medición precisos, disponibilidad de datos de reconocimiento y medición a bordo y evaluación del proceso mediante la visualización/evaluación de los recorridos, perfiles y zonas dragadas, intensidad del dragado, etc.).
- Para mejorar el proceso de dragado se deberá llevar a cabo un control efectivo del proceso (medidas en continuo, control del área, rumbo y velocidad de la draga, posición de los cabezales de succión, de la retroexcavadora..., medida de la velocidad de mezcla y concentración, diagrama de la carga, sistema de medida de la cántara de vigilancia del proceso de llenado), mejorando las técnicas de producción (sistemas de succión que mejor se adapten, bombas de dragado sumergidas, instalaciones de degasificación, etc.) y empleando técnicas selectivas de dragado (por ejemplo, dragado selectivo para separar el material contaminado).

### **3. MEJORES PRÁCTICAS AMBIENTALES PARA EL VERTIDO O CONFINAMIENTO DE LOS MATERIALES**

1.- Suspender las operaciones de vertido al mar en situaciones meteorológicas (oleaje, viento, corriente) que no permitan asegurar la deposición del material dragado en la zona autorizada.

2.- En aquellas actuaciones en las que se detecte un contenido significativo de residuos sólidos de origen antrópico, la embarcación deberá estar dotada de los dispositivos necesarios para su separación del material sedimentario. Dichos residuos deberán ser gestionados adecuadamente en tierra en lugar de ser vertidos al mar.

3.- Restricciones temporales (por ejemplo en determinados estados de la marea o estacionales) para las operaciones de vertido de manera que se eviten interferencias con la reproducción o migración de especies marinas.

4.- Planificación de la operación de vertido de manera que materiales diferentes se dispongan de tal modo que su distribución ayude al aislamiento de aquellos materiales que sean potencialmente más contaminantes.

5.- Técnicas de confinamiento previas al vertido de los materiales de categoría C que contribuyan a mejorar sus resultados, siempre y cuando se cumpla con lo dispuesto en el artículo 27.2.

6.- Restricción o prohibición de actividades (como pudiera ser la pesca de arrastre) que pudieran alterar la capa de recubrimiento en zonas de confinamiento de los materiales.

## ANEJO VI: GUÍA PARA LA REALIZACIÓN DEL ESTUDIO DE USOS PRODUCTIVOS

1. El estudio de usos productivos se realizará, con carácter general, para los materiales a dragar exentos de caracterización química y biológica y para los materiales a dragar incluidos dentro de las categorías A y B, es decir, para materiales no contaminados o con concentraciones moderadas de contaminantes. El objetivo del estudio, será la evaluación de las diferentes alternativas de usos productivos de los materiales de dragado frente a su vertido al mar.

2. Para los materiales clasificados como pertenecientes a la categoría C o como residuos no peligrosos, para los que únicamente cabe la utilización de una técnica adecuada de confinamiento o su tratamiento, se deberá considerar su utilización como material de relleno, que tendrá la consideración de uso productivo. Asimismo, si el material es sometido a una técnica de tratamiento, se deberá considerar la posibilidad de usos productivos tras la misma.

3. El estudio de usos productivos se desarrollará siguiendo los siguientes pasos:

### **Consideración de las diferentes opciones de usos productivos en ubicaciones en el DPMT**

4. Se deberán considerar los diversos usos productivos a los que puede ser sometido un material dragado no contaminado, entre los que cabe destacar:

#### Usos en obras públicas:

- Regeneración y creación de playas. Trasvases.
- Creación de tierra firme y mejora de terrenos.
- Rellenos, sustituciones y recubrimientos.
- Construcción de bermas sumergidas.
- Defensa de costas como creación de barras, protección de taludes, etc.
- Construcción de diques y presas de tierra.

- Regeneración de suelos contaminados.

Usos en agricultura y pesca:

- Creación y mejora de tierra vegetal (limitada cuando se trate de sedimentos marinos por efecto de la salinidad).
- Acuicultura, regeneración de bancos marisqueros.
- Mejora de recursos pesqueros.

Usos en medio ambiente:

- Regeneración de fondos marinos contaminados.
- Regeneración y creación de zonas húmedas.
- Creación de islas de nidificación.

**Evaluación de la oferta y la demanda en cuanto al suministro de materiales de dragado**

5. Se deberá evaluar si los materiales de dragado cubren las necesidades de los usos productivos considerados en cuanto a cantidad y si están disponibles para su uso en el momento oportuno.

**Caracterización de los materiales a dragar**

6. En principio, la caracterización de los materiales de acuerdo con las presentes Directrices puede resultar suficiente para evaluar su potencial utilización para un uso productivo, si bien en determinadas ocasiones podría requerirse de la determinación de parámetros complementarios como el pH, la salinidad y los nutrientes si se considera, por ejemplo, utilizar el material para usos agrícolas o bacteriología si el material se destina a regeneración de zonas de baño.

7. Un aspecto importante a tener en consideración son las características granulométricas de los materiales, ya que los diferentes usos productivos previstos dependen en gran medida de la distribución del tamaño de grano de los sedimentos.

8. Para el caso específico de utilización del material dragado para su aporte a playas se estará a lo dispuesto en su regulación específica.

9. Por último, en el caso de los usos productivos en obras públicas se deberá considerar la determinación de parámetros geotécnicos, mineralógicos y reológicos y la realización de pruebas de asentamiento y de consolidación de los materiales que aseguren la integridad y la estabilidad de las obras.

10. Si fuera necesaria una caracterización adicional de los materiales a dragar, se diseñará una nueva toma de muestras según lo establecido en el Capítulo III de las presentes Directrices.

11. De manera indicativa se presentan en la tabla 1 los aspectos de la calidad del material a dragar que deberán considerarse en cada uso productivo.

**Tabla 1**

**Aspectos de la calidad del material de dragado a considerar en el análisis de usos productivos**

Opciones de uso	Tamaño grano	COT	Nutrientes	Desechos	Contamin orgánica	Metales	Contenido en sales	Valores estéticos	Toxicidad
<b>Usos en obras públicas</b>									
Creación de tierra firme y mejora de terrenos	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Rellenos, sustituciones y recubrimientos	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Regeneración y creación de playas.	*			*	*	*		*	*



Trasvases									
Construcción de bermas sumergidas	*	*	*	*	*	*			*
Defensa de costas como creación de barras, protección de taludes, etc.	*	*		*	*	*			
Construcción de diques y presas de tierra	*	*		*	*	*			
<b>Usos en agricultura y pesca</b>									
Creación y mejora de tierra vegetal	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Acuicultura y regeneración de bancos marisqueros	*	*	*	*	*	*	*		*
Mejora de recursos pesqueros	*	*	*	*	*	*	*		*
<b>Usos en medio ambiente</b>									
Regeneración fondos marinos contaminados	*	*	*	*	*	*			*
Regeneración y creación de zonas húmedas	*	*	*	*	*	*	*	*	*
Creación de islas de nidificación	*	*	*	*	*	*	*	*	*

## Selección del emplazamiento

12. Se deberá seleccionar el emplazamiento más adecuado para el uso productivo previsto para los materiales de dragado.

### **Viabilidad técnica**

13. Se deberá evaluar la viabilidad técnica para implementar un uso productivo concreto en un lugar determinado. Se considerarán los métodos de dragado, los equipos necesarios para la ejecución de la obra, la distancia a cubrir en el transporte de los materiales, las necesidades de un almacenamiento intermedio y de tratamiento ex situ para los mismos (separación, contención, consolidación, desecación, bioremediación, inmovilización química y estabilización, inmovilización térmica, etc.), la adecuación del emplazamiento de los materiales de dragado (aislamiento, contención, desbroce), los sistemas de colocación de los materiales en el lugar elegido (difusores, impulsión por cañón o “rainbow”, colocación en el fondo marino, etc.) y la necesidad de tareas de mantenimiento y vigilancia.

14. Se deberán tener en cuenta, además, las limitaciones técnicas en cuanto a distancias de bombeo, profundidad de la masa de agua, accesos, existencia de infraestructuras, etc.

### **Consideraciones normativas**

15. Los usos productivos considerados junto con el emplazamiento seleccionado cumplirán con la normativa en vigor, y, de manera particular, las disposiciones establecidas por la Ley 22/1988, de 28 de julio, de Costas y el Real Decreto 876/2014, de 10 de octubre, por el que se aprueba el Reglamento General de Costas. en lo referente a los dragados y las extracciones de áridos del mar, y la normativa sectorial y autonómica que le sea de aplicación.

### **Evaluación de la aceptabilidad ambiental**

16. Se deberán evaluar los potenciales efectos adversos de los usos productivos considerados sobre el medio ambiente, en concreto:

- Fauna (bioacumulación, ecotoxicidad y biomagnificación).

- Flora (bioacumulación y ecotoxicidad).
- Aguas subterráneas (contaminación de las aguas subterráneas y de la red trófica).
- Aguas superficiales (contaminación de las aguas superficiales y de la red trófica).
- Suelo (contaminación y erosión).
- Aire (contaminación, polvo y olores).
- Impactos sobre el paisaje, impactos visuales, económicos y sobre los usos del suelo.

17. Si se identificaran impactos potenciales significativos, el proyecto de implantación del uso productivo deberá descartarse o se deberán realizar modificaciones en el mismo que aseguren su viabilidad ambiental

### **Vigilancia y Seguimiento**

18. Se definirá un programa de vigilancia con el fin de verificar el impacto del uso productivo adoptado y de su funcionamiento. El programa constará de vigilancia física para comprobar la integridad y estabilidad de la obra realizada y de vigilancia ambiental de los efectos sobre la flora, la fauna y la calidad de las aguas, ajustando su extensión temporal y la periodicidad de los controles en función de las características de los materiales y los resultados que vayan obteniéndose en el propio programa de vigilancia.

## BIBLIOGRAFÍA

- Arizzi Novelli, A., Picone, M., Losso, C., Volpi Ghirardini, A. 2004. Ammonia as confounding factor in ecotoxicity tests with the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk). *Ecotoxicological and Environmental Chemistry*, 85 (4-6), pp. 183-191(9).
- Arizzi Novelli, A., Losso, C., Falugi, C., Giuliani, S., Kozinkova, L., Lera, S., Leoni, T., Manzo, S., Mazziotti, C., Pellegrini, D., Picone, M., Volpi Ghirardini, A. 2007. Fertilization test with the the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lmk). *Biol. Mar. Medit.*, 14 (1), pp. 52-56.
- Arizzi Novelli, A., Losso, C., Volpi Ghirardini, A., Ghetti, P.F. 2007. Ecotoxicity bioassays with the sea urchin *Paracentrotus lividus*: validatin of methods for transitional environments using a quality assurance/quality control procedure. *Biol. Mar. Medit.*, 14 (1), pp. 99-101.
- ASTM, 2003, E 1367-03, Standard Test Method for Measuring the Ecotoxicity of Sediment-Associated Contaminants with Estuarine and Marine Invertebrates.
- ASTM, 2004, E 1563-04, Standard guide for conducting static acute ecotoxicity tests with echinoid embryos.
- Azur environmental, 1998. *Microtox acute toxicity test*.
- Bay, S.M., Jirik, A., Asato, S. 2003. Interlaboratory variability of amphipod sediment ecotoxicity tests in a cooperative regional monitoring program. *Environmental Monitoring and Assessment*, Vol. 81, N. 1-3, 257-268(12).
- Beiras, R., Durán, I., Bellas, J., Sánchez-Marín, P. 2012. Biological effects of contaminants: *Paracentrotus lividus* sea-urchin embryo test (SET) with marine sediment elutriates. *ICES Techniques in Marine Environmental Sciences*, No. 51, 12 pp. ISBN: 978-87-7482-111-3.
- BEQUALM. [online] 2006. Biological Effects Quality Assurance in Monitoring Programme. Disponible en Internet: <<http://www.bequalm.org>>.
- Brils, J.M., Huwer, S.L., Kater, B.J., Schout, P.G., Harmsen, J., Delvigne, G.A., Scholten, M.C: 2002. Oil effect in freshly spiked marine sediments on *Vibrio fischeri*, *Corophium volutator*, and *Echinocardium cordatum*. *Environ. Ecotoxicol. Chem.*, 21(10), pp. 2242-51.
- Campisi, T. et al. 2005. Effect of sediment turbidity and color on light output measurement for Microtox® Basic Solid-Phase Test. *Chemosphere* 60: 9-15.
- Casado Martínez, M.C. et al. 2004. Ejercicio interlaboratorio de bioensayos marinos para la evaluación de la calidad ambiental de sedimentos costeros en España II. Ensayo de

inhibición de la bioluminiscencia para la evaluación rápida de la toxicidad de sedimentos. *Ciencias marinas* 32(1B): 129-138.

Casado-Martínez, M.C.. et al. 2006. Ejercicio interlaboratorio con bioensayos marinos para la evaluación de la calidad ambiental de sedimentos costeros. III. Bioensayo con embriones del erizo de mar *Paracentrotus lividus*. *Ciencias Marinas*, 32 (1B): 139-147.

Catoira Gómez, J.L., Mosquera Tallón, G., Martínez Patiño, D. 1995. Informe Técnico de la Consellería de Pesca, Marisqueo e Acuicultura - Proyecto de cultivo de erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck) en laboratorio y de seguimiento en medio natural. Planes Nacionales de Cultivos Marinos. 1994. JACUMAR.

CCREM.1987. Canadian Water Quality Guidelines. Canadian Council of Resource and Environment Ministers, Task Force on Water Quality Guidelines, Environment Canada, Ottawa, Ontario.

CEDA & IADC, 2008: Environmental Aspects of Dredging, Edited by R. N. Bray. Taylor and Francis. ISBN 978-0-415-45080-5

CEDA, 2010: Information Paper - Dredged Material as a Resource. Options and Constraints.

CEDEX, 1994. Recomendaciones para la Gestión del Material de Dragado en los Puertos Españoles.

CEDEX, 1999. Informe Técnico para Puertos del Estado: Determinación de las Concentraciones de Fondo Preindustriales y Concentraciones Actuales en los Sedimentos del Litoral Marino Español. CEDEX: 23-495-9-129.

CEDEX, 1999. Informe Técnico para Puertos del Estado: Estudios de Normalización Física y Geoquímica de los Sedimentos Portuarios, para la Determinación de la Carga Antropogénica de Metales Pesados. CEDEX: 23-496-9-131

CEDEX, 2002. Informe Técnico para Puertos del Estado: Estudio sobre los ensayos biológicos para determinar la nocividad de los sedimentos contaminados. CEDEX: 23-496-9-136.

CEDEX, 2004. Informe Técnico para Puertos del Estado: Caracterización del Material Dragado mediante Ensayos Biológicos. CEDEX: 23-403-9-188.

CEDEX, 2008. Informe Técnico para Puertos del Estado: Estudio de Intercomparación Analítica de parámetros relacionados con la caracterización ambiental de sedimentos portuarios. CEDEX: 22-404-9-204.

CEDEX, 2008. Informe Técnico para Puertos del Estado: "Bases para la adaptación de las Recomendaciones para la gestión del material dragado al progreso científico y armonización con otras Normativas. CEDEX: 23-403-9-194.

CEDEX, 2009. Informe Técnico para Puertos del Estado: Investigación sobre Bioensayos para la caracterización del material de dragado. CEDEX: 23-407-9-004.

CEDEX, 2012. Informe Técnico para DG de Calidad y Evaluación Ambiental y Medio Natural: Estudio Sobre Generación, Caracterización y Destino de los Materiales de Dragado: Guía para la caracterización y destino de los materiales de dragado de acuerdo a la ley 22/2011. CEDEX: 23-409-5-003.

CEDEX, 2013. Informe Técnico para DG de Sostenibilidad de la Costa y del Mar: Instrucción para la ejecución de obras de aportación de áridos en la costa. Aspectos ambientales. CEDEX: 23-412-5-001.

CEDEX, 2014. Informe Técnico para Puertos del Estado: Inventario de dragados en los puertos españoles. Actualización 2013. CEDEX: 23-410-5-001.

Collier, L.M. & Pinn, E.H. 1998. An assessment of the acute impact of the sea lice treatment ivermectin on a benthic community. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 230, 131-147.

Convenio de Londres, 2005. Guidelines for the Sampling and Analysis of Dredged Material Indented for Disposal at Sea.

Convenio de Londres, 2008. Waste Assessment Guidance: Guidance for the Development of Action Lists and Action Levels for Dredged Material. Draft Guidance for the Development of Action Lists and Action Levels. Scientific Group of the London Convention. LC/SG 31/3/1.

Convenio de Londres, 2013. Revised Specific Guidelines for Assessment of Dredged Material.

Craeymeersch, J.A., Piet, G.J., Rijnsdorp, A.D., Buijs, J. 2000. Distribution of macrofauna in relation to the micro-distribution of trawling effort. In *Effects of fishing on non-target species and habitats: biological, conservation and socio-economic issues* (ed. M.J. Kaiser and S.J. Groot), 187-197. Oxford: Blackwell Science Limited.

Cronin M., McGovern E., McMahon T. & Boelens R., 2006. Guidelines for the Assessment of Dredge Material for Disposal in Irish Waters. *Marine Environment and Health Series, No. 24, 2006.*

DeIvals, 2007. Diseño de modelos integrados de evaluación de la contaminación y sus efectos sobre los ecosistemas marinos y litorales y la salud humana. CEPRECO, Madrid, Ministerio de la Presidencia, 94 pp.

DeIvals et al., 2004. Chemical and ecotoxicological guidelines for managing disposal of dredged material. *Trends Analytical Chemistry* 23, p. 819-828.

DeWitt, T.H., R.C. Swartz, J.O. Lamberson. 1989. Measuring the acute ecotoxicity of estuarine sediments. *Environmental Ecotoxicology Chemistry*, 8: 1035-1048.

DeWitt, T.H., M.S. Redmond, J.E. Sewall, R.C. Swartz. 1992. Development of a Chronic Sediment Ecotoxicity Test for Marine Benthic Amphipods. U.S. Environmental Protection Agency. CBT/TRS/89/93.

Dinnel, P.A., Link J.M., Stober, Q.J., Letorneau, M.W., Roberts, W.E. 1989. Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticide ecotoxicity tests. *Archives Environmental Contamination and Ecotoxicology* 18, p.748-55.

Edmunds, M., Hart, S., Ingwersen, C., Robinson, J. 2004. Port Phillip Bay Channel Deepening Study Environmental Effects Statement- Marine Ecology Specialist Studies. Volume 19: Sediment Biota Impact and Risk Assessment. Report to Port of Melbourne Corporation and Parsons Brinckerhoff. Australian Marine Ecology Report 177, Melbourne, 120 pp.

Environment Australia. 2002. National Ocean Disposal Guidelines for Dredged Material. ISBN 0 642 54831 5.

Environment Canada, 1992, Biological test method: fertilization assay using echinoids (sea urchins and sand dollars), Environmental Protection Series, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/27.

Environment Canada. 1992. Biological Test Method: Acute Test for Sediment Ecotoxicity Using Marine or Estuarine Amphipods, Environment Protection Service, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/26.

Environment Canada. 1994. Guidance Document on Collection and Preparation of Sediments for Physicochemical Characterization and Biological Testing, Environment Protection Service, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/29, 144 pp.

Environment Canada. 1998. Biological Test Method: Reference Method for Determining Acute Lethality of Sediment to Marine or Estuarine Amphipods, Environment Protection Service, Ottawa, ON, Report EPS 1/RM/35.

EPS 1/RM/26, 1992, Acute Test for Sediment Ecotoxicity Using Marine or Estuarine Amphipods.

Fernández, N., & Beiras, R. 2001. Combined ecotoxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicology*, 10, pp. 263-271.

Fernández Méijome, I., Fernández, S., Beiras, R. 2006. Assessing the ecotoxicity of sandy sediments six months after the prestige oil spill by means of the sea-urchin embryo-larval bioassay. *Thalassas*, 22(2), pp. 45-50.

Geffard, O., Budzinski, H., Augagneur, S., Seaman, M.N.L., His, E. 2001. Assessment of sediment contamination by spermioecotoxicity and embryoecotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentrotus lividus*) and oysters (*Crassostrea gigas*). *Environmental Ecotoxicology and Chemistry*, 20 (7), pp. 1605-1611.

Giuliani, S., Della Torre, C., Penna, M., Amato, E. 2007. Bioassays for the efficacy evaluation of inertization treatments. *Biol. Mar. Medit.* 14(1), pp. 135-137.

Grosjean, P. 2001. Growth model of the reared sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). . Tesis de Doctorado, Université Libre de Bruxelles.

Hiscock, K., Langmead, O., Warwick, R. 2004. Identification of seabed indicator species from time-series and other studies to support implementation of the EU Habitats and Water Framework Directives. *Report to the Joint Nature Conservation Committee and the Environment Agency from the Marine Biological Association*. Plymouth: Marine Biological Association. JNCC Contract F90-01-705. 109 pp.

ICRAM-APAT, 2006, Manuale per la movimentazione di sedimenti marini. Ministero dell'Ambiente e della Tutela del Territorio e del Mare.

Kelly, M.S. 2005. Echinodermata. Series: Progress in Molecular and Subcellular Biology. Subseries: Progress in Molecular and Subcellular Biology. Ed. Matranga, V. Capítulo: Echinoderms: Their Culture and Bioactive Compounds, pp. 139-165.

Kozinkova, L., Ennas, C., Giuliani, S., Pellegrini, D. 2003. Valutazione della qualità dei gameti di *Paracentrotus lividus* (Lamarck) utilizzando  $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  come tossico di riferimento su animali stabulati e non stabulati. *Biol. Mar. Medit.* 10 (2), pp. 1101-1104. Lappalainen, J. et al. 2001. Automated color correction method for



*Vibrio fischeri* toxicity test. Comparison of standard and kinetic assays. *Chemosphere* 45 (4-5): 635-641.

Lera, S., Macchia, S., Pellegrini, D. 2006. Standardizing the methodology of sperm cell test with *Paracentrotus lividus*. *Environmental Monitoring and Assessment*, 122, pp. 101-109.

Lera, S. & Pellegrini, D. 2006. Evaluation of the fertilization capacity of *Paracentrotus lividus* sea urchin stored gametes by the exposure to different aqueous matrices. *Environmental Monitoring and Assessment*, 119, pp. 1-13.

Long, E.R., MacDonald, D.D., Smith, S.L., Calder, F.D., 1995. Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management* 19, 81–97.

Lorenzo J.I., Nieto O., Beiras R. 2002. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. *Aquat. Toxicol.* 58: 27–41.

Marina, M.G., Rosb, L. D., Moschinoa, V., Campesanb, G. 2001. Sediment elutriate ecotoxicity testing with embryos of sea urchin (*Paracentrotus lividus*). *Aquatic Ecosystem Health and Management* 4(2), pp. 215-221.

Montero Torreiro, M.F. 2000. Análisis de la composición bioquímica y de posibles biomarcadores de contaminación en el erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, Lmk. Tesis de Doctorado, Universidad de Santiago de Compostela.

National Institute for Coastal and Marine Management/RIKZ, 2002. Standard Operating Procedure Nr: SPECIE-02 (SOP-02 ). Microtox™ Solid Phase (*Vibrio fischeri*) Sediment Toxicity Test.

Norma Técnica de Prevención 433. 1996. NTP 433: Prevención del Riesgo en el Laboratorio. Instalaciones, Material de Laboratorio y Equipos. Rosell, M.G., Guardino, X., Gadea, E. Eds. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales, Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo.

OSPAR, 2002. JAMP Guidelines for Monitoring Contaminants in Sediments (Agreement 2002-16)

OSPAR, 2004. Revised OSPAR Guidelines for the Management of Dredged Material (Agreement 2004-08).

OSPAR, 2008. Overview of Contracting Parties' National Action Levels for Dredged Material (2008 Update). Publication Number: 2008/363.

OSPAR 2009. Guidelines for the Management of Dredged Material (Reference number: 2009/4)

OSPAR, 2014. OSPAR Guidelines for the Management of Dredged Material at Sea (Agreement 2014-06). En <http://www.ospar.org>

PIANC, 1992. Beneficial Uses of Dredged Material: A Practical Guide, Report of Working Group No. 19.

PIANC, 1996. Handling and Treatment of Contaminated Dredged Material from Ports and Inland Waterways, Report of Working Group No. 17 of the Permanent Technical Committee 1 - Supplement to PIANC Bulletin No. 89.

PIANC, 1997. Dredged Material Management Guide. Special Report of the Permanent Environmental Commission – Supplement to Bulletin no.96.

PIANC 1998: Management of Aquatic Disposal of Dredged Material.- Report EnviCom WG 1.

PIANC, 2002: Environmental Guidelines for Marine, Near shore, and Inland confined Disposal Facilities (CDF's) for Contaminated Dredged Material.- Report EnviCom WG 5.

PIANC, 2006: Generic Biological Assessment Guidance for Dredging and Disposal.- Report of EnviCom WG 8.

PIANC, 2006: Environmental risk assessment in dredging and dredged material disposal.- Report of EnviCom WG 10.

PIANC, 2009: Dredging Management Practices for the Environment.-Report no.100, EnviCom WG 13.

PIANC, 2009: Dredged Material as a Resource. Report no.104, EnviCom WG 14.

PIANC, 2009: Long term management of Confined disposal facilities.- Report no.109, EnviCom WG 11.

PARCOM Protocols on Methods for the Testing of Chemicals Used in the Offshore Industry, 2005.

Plan de Acción del Mediterráneo. 1999. Directrices para el Manejo de los Materiales de Dragado. MAP Technical Reports Series No. 129.

Plan Nacional del Cultivo del Erizo. 2006-2009. Informe de Sostenibilidad Ambiental del Fondo Europeo de la Pesca 2007-2013. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación - Unión Europea.

Qiao, D., Nikitina, L. A., Buznikov, G. A., Lauder, J. M., Seidler, F. J., Slotkin T. A. 2003. The sea urchin embryo as a model for mammalian developmental neuroecotoxicity: ontogenesis of the high-affinity choline transporter and its role in cholinergic trophic activity. *Environmental Health Perspectives* 111, pp. 1730–1735.

Radenac, G., Fichet, D., Miramand, P. 2000. Bioaccumulation and ecotoxicity of four dissolved metals in *Paracentrotus lividus*. *Marine Environmental Research*, 51(2), pp. 151-166.

Riba et al., 2004. Sediment Quality in the Atlantic Coast of Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 271-282.

RIKZ. 2000. The 14day marine urchin *Echinocardium cordatum* mortality and behaviour sediment ecotoxicity test. Standard Operating Procedure, Specie-03.

RIKZ. 2004. The 10day Marine Amphipod *Corophium volutator* Mortality Sediment Ecotoxicity Test. Standard Operating Procedure, Specie-01.

Ringwood, A.H. et al. 1997. Interpretation of Microtox® Solid-Phase toxicity tests: the effects of sediment composition. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16 (6): 1135-1140.

Röper, H.; Netzband, A. (2011). Assessment criteria for dredged material with special focus on the North Sea region. Hamburg Port Authority (HPA): Hamburg. 36 pp. En [http://www.sednet.org/download/Dredged\\_Material\\_Criteria\\_North\\_Sea\\_0611.pdf](http://www.sednet.org/download/Dredged_Material_Criteria_North_Sea_0611.pdf)

Saco-Álvarez, L., Durán, I., Lorenzo, J.I., Beiras, R. 2010. Methodological basis for the optimization of a marine sea-urchin embryo test (SET) for the ecological assessment of coastal water quality. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73: 491-499.

Sánchez-España, A.I., Martínez-Pita, I., García, F.J. 2004. Gonadal growth and reproduction in the commercial sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) (Echinodermata: Echinoidea) from southern Spain. *Hydrobiologia*, 519, pp. 61-72.

Scarlett, A., Rowland, S.J., Canty, M., Smith, E.L., Galloway, T.S. 2007. Method for assessing the chronic ecotoxicity of marine and estuarine sediment-associated contaminants using the amphipod *Corophium volutator*. *Marine Environmental Research*, 63: 457-470.

Scout, K.J. & M.S. Redmond. 1989. The effects of a contaminated dredged material on laboratory populations of the tubicolous amphipod, *Ampelisca abdita*. En *Aquatic Ecotoxicology and Hazard Assessment: 12th Volume*, ASTM STP 1027. U.M. Cowgill & Williams, Eds. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA. 289-303.

Schlosser, S.C., Lupatsch, I., Lawrence, J.M., Lawrence, A.L., Shpigel, M. 2005. Protein and energy digestibility and gonad development of the European sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck) fed algal and prepared diets during spring and fall. *Aquaculture Research*, 36, pp. 972-982.

Spirlet, C., Grosjean, P., Jangoux, M. 2001. Cultivation of *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) on extruded feeds: digestive efficiency, somatic and gonadal growth. *Aquaculture Nutrition*, 7, pp. 91-99.

Stronkhorst, J. 2003. *Ecotoxicological effects of Dutch harbour sediments*. Vrije Universiteit. Amsterdam.

Swartz, R.C., W.A. DeBen, J.K.P. Jones, J.O. Lamberson, F.A. Code. 1985. Phoxocephalid amphipod bioassay for marine sediment ecotoxicity. En *Aquatic Ecotoxicology and Hazard Assessment: 7<sup>th</sup> Volume*, ASTM STP 854, R.D. Cardwell, R. Purdy, y R.C. Bahner, eds., American Society for Testing and Materials.

Tomasovic, M., F.J. Dwyer, I.E. Greer, C.G. Ingersoll. 1995. Recovery of known-age *Hyadella azteca* from Sediment Toxicity Test. *Environmental Toxicology Chemistry*, 14 (1995); pp 1177-1180.

UNE-EN ISO 11348-3. 1999. *Calidad del agua. Determinación del efecto inhibitor de muestras de agua sobre la luminiscencia de Vibrio fischeri (ensayo de bacterias luminiscentes). Parte 3: método utilizando bacterias liofilizadas*.

UNEP/WHO.1995. *Determination of faecal coliforms in sediments by the pour plate (PP) method*. Reference Methods For Marine Pollution Studies No. 47 (Rev 1). En <http://195.97.36.231/acrobatfiles/NonMAP/RefMethods/47rev1eng.pdf>.

USEPA, 1991, Evaluation of Dredged Material Proposed for Ocean Disposal: Testing Manual EPA-503/91/001. US-EPA Office of Water (WH-556F).

USEPA, 2001. 2001 Update of Ambient Water Quality Criteria for Cadmium. Office of Science and Technology Office of Water. Report: EPA-822-R-01-001.

Volpi Ghirardini, A., Arizzi Novelli, A., Likar, B., Pojana, G., Ghetti, P. F., Marcomini, A. 2001. Sperm cell ecotoxicity test using sea urchin *Paracentrotus lividus* Lamarck

(Echinodermata: Echinoidea): Sensitivity and discriminatory ability toward anionic and nonionic surfactants. *Environmental Ecotoxicology and Chemistry*, 20(3), pp. 644-651.

Volpi Ghirardini, A.V., Novelli, A.A., Losso, C., Ghetti, P.F. 2003. Sea urchin ecotoxicity bioassays for sediment quality assessment in the lagoon of Venice (Italy). *Chemistry and Ecology*, 19 (2-3), pp. 99-111(13).

Volpi Ghirardini, A.V., Novelli, A.A., Tagliapietra, D. 2005. Sediment ecotoxicity assessment in the lagoon of Venice (Italy) using *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fertilization and embryo bioassays. *Environment International*, 31, pp. 1065-1077.