



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA

CAMPUS DE **GANDIA**

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Escuela Politécnica Superior de Gandia

Estudio de toxicidad de sedimentos generados por la
DANA en el municipio de Massanassa (Valencia)

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ciencias Ambientales

AUTOR/A: Gurrea Gonzalez, Laura

Tutor/a: Falco Giaccaglia, Silvia Laura

Cotutor/a: Sebastiá Frasquet, María Teresa

CURSO ACADÉMICO: 2024/2025

RESUMEN

El episodio meteorológico de Depresión Aislada en Niveles Altos (DANA), ocurrido en la provincia de Valencia el 29 de octubre de 2024, provocó impactos ambientales, entre ellos la acumulación de sedimentos potencialmente contaminantes en varios municipios, incluido Massanassa. Las precipitaciones intensas y el desbordamiento de barrancos movilizaron residuos de origen urbano, natural e industrial. En este estudio, se realizó una caracterización fisicoquímica de sedimentos recogidos en varios puntos del término municipal de Massanassa, así como la evaluación de toxicidad a través de dos bioensayos, con *Artemia franciscana* y *Paracentrotus lividus*. Los resultados del bioensayo con *A. franciscana*, indicaron una baja mortalidad (2,15%-5,75%) y una ausencia en términos de toxicidad aguda. En el caso del bioensayo con *P. lividus*, aunque se no se detectó toxicidad aguda en la variable de éxito embrionario, se observó una disminución notable en la longitud larvaria de hasta un 34%, lo que sugiere efectos subletales asociados a factores complejos. La caracterización fisicoquímica analizó los parámetros de contenido en humedad, conductividad eléctrica, materia orgánica y pH, aunque no se identificó una relación directa. En conjunto, el estudio evidenció una alteración ambiental en términos toxicológicos derivados de la DANA, y la importancia de la investigación futura para plantear estrategias de gestión ambiental ante fenómenos climáticos extremos.

Palabras Clave: DANA, sedimentos contaminantes, toxicidad, bioensayos, degradación ambiental, *Artemia franciscana*, *Paracentrotus lividus*.

ABSTRACT

The meteorological episode of Isolated Depression at High Levels (DANA), which occurred in the province of Valencia on October 29, 2024, caused environmental impacts, including the accumulation of potentially polluting sediments in several municipalities, including Massanassa. Heavy rainfall and overflowing of ravines mobilized urban, natural, and industrial waste. In this study, a physicochemical characterization of sediments collected at several points of the municipality of Massanassa was carried out, as well as the toxicity evaluation through two bioassays, with *Artemia franciscana* and *Paracentrotus lividus*. The bioassay results with *A. franciscana* indicated a low mortality (2.15%-5.75%) and no acute toxicity. In the case of the *P. lividus* bioassay, although acute toxicity was not detected in the embryo success variable, a notable decrease in larval length of up to 34% was observed, suggesting sublethal effects associated with complex factors. The physicochemical characterization analyzed the parameters of moisture content, electrical conductivity, organic matter, and pH, although no direct relationship was identified. Overall, the study showed an environmental alteration in toxicological terms derived from DANA, and the importance of future research to formulate environmental management strategies for extreme climate events.

Keywords: DANA, contaminant sediments, toxicity, bioassay, environmental degradation, *Artemia franciscana*, *Paracentrotus lividus*.

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 CONCEPTO E IMPACTO AMBIENTAL DE LA DANA	1
1.2 IMPACTO DE LA DANA EN LA PROVINCIA DE VALENCIA.....	2
1.3 CONTAMINACIÓN Y RIESGOS ASOCIADOS A LOS SEDIMENTOS	6
1.4 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AMBIENTAL CON P. LIVIDUS Y A. FRANCISCANA	8
2.OBJETIVOS	10
3.MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
3.1. MUESTREO DE SEDIMENTOS EN EL MUNICIPIO DE MASSANASSA	11
3.1.1 PUNTOS DE MUESTREO	11
3.2 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DE LOS SEDIMENTOS	15
3.2.1 MEDICIÓN DE LA HUMEDAD	16
3.2.2 DETERMINACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA	16
3.2.3 MEDICIÓN DEL pH	16
3.2.4 MEDICIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA	17
3.3. FUNDAMENTOS DE LOS BIOENSAYOS UTILIZADOS	17
3.4 ELABORACIÓN DEL ELUTRIADO DE LOS SEDIMENTOS.....	17
3.5 BIOENSAYO CON ARTEMIA FRANCISCANA	19
3.5.1 PREPARACIÓN Y ECLOSIÓN	19
3.5.2 ENSAYO DE TOXICIDAD CON TÓXICO DE REFERENCIA EN ARTEMIA FRANCISCANA.....	20
3.5.3 ENSAYO DE TOXICIDAD DE LAS MUESTRAS DE SEDIMENTO	22
3.6 BIOENSAYO CON PARACENTROTUS LIVIDUS.....	23
3.6.1. PROCESO DE MUESTREO DE ERIZOS	23
3.6.2 EXTRACCIÓN DE GAMETOS	24
3.6.3 PROCESO DE FECUNDACIÓN IN VITRO	25
3.6.4 INCUBACIÓN Y DESARROLLO LARVARIO	27
3.6.5 PRUEBA DE TOXICIDAD CON MUESTRAS DE SEDIMENTOS.....	27
3.6.6 DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS DE VARIABLES EXPERIMENTALES	28
3.7 CRITERIOS DE VALIDACIÓN DEL ENSAYO (BLANCO-CONTROL)	29
3.8 CRITERIOS DE TOXICIDAD EN LAS MUESTRAS	29
3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS.....	30
4. RESULTADOS.....	31
4.1 CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA.....	31
4.2 BIOENSAYO CON ARTEMIA FRANCISCANA	32
4.2.1 ESTUDIO TOXICOLÓGICO CON TÓXICO DE REFERENCIA.....	32
4.2.2 ESTUDIO TOXICOLÓGICO CON MUESTRAS	33

4.3 BIOENSAYO CON <i>P. LIVIDUS</i>	34
4.3.1 DESARROLLO EMBRIONARIO.....	34
4.3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA TOXICIDAD DE LAS MUESTRAS	34
4.3.5 LONGITUD DE LAS LARVAS	36
4.3.6 FASE DE DESARROLLO LARVARIO	38
5. DISCUSIÓN	39
6. CONCLUSIÓN	42
7. BIBLIOGRAFÍA	43

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de lluvia acumulada (l/m^2) en estaciones meteorológicas valencianas el 29 de octubre de 2024.....	3
Tabla 2. Volúmenes de cada componente para la obtención de las concentraciones para el ensayo con el tóxico de referencia	21
Tabla 3. Volúmenes del elutriado de las muestras en las placas multipocillo	23
Tabla 4. Resultados de los parámetros fisicoquímicos analizados en muestras de sedimento, M.1 a M.6	31
Tabla 5. Mortalidad resultante tras el periodo de exposición de las muestras a <i>Artemia franciscana</i>	33
Tabla 6. Datos resultantes del test de mortalidad de Kruskal-Wallis a los grupos del blanco y las muestras para <i>Artemia franciscana</i>	33
Tabla 7. Tasa de éxito de desarrollo por réplica.....	34
Tabla 8. Datos obtenidos en el test de Curtosis en los grupos del blanco y las muestras para <i>P. lividus</i>	34
Tabla 9. Resultados del test de Leven para homogeneidad de varianza en los grupos de blanco y las muestras para <i>P. lividus</i>	35
Tabla 10. Valores del análisis ANOVA para el grupo del blanco y las muestras (1,2,3,4,6) para	35
Tabla 11. Valores del test de Kruskal-Wallis para el grupo del blanco y las muestras para <i>Artemia Franciscana</i>	35
Tabla 12. Longitud media de las larvas por cada muestra, M.1 a M.6	36
Tabla 13. Resultados del coeficiente estadístico de Curtosis para el grupo del blanco y las muestras para <i>Paracentrotus lividus</i>	37
Tabla 14. Valores del test de Levene para el grupo del blanco y las muestras para <i>Paracentrotus lividus</i>	37
Tabla 15. Comparación múltiple de las muestras respecto del control por el análisis ANOVA.	37
Tabla 16. Estadios larvarios observados en el bioensayo de <i>Paracentrotus lividus</i>	38
Tabla 17. Valores de DL50 en otros estudios con tóxico de referencia en bioensayos con <i>A. franciscana</i>	39
Tabla 18. Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030.	47

1.INTRODUCCIÓN

1.1 CONCEPTO E IMPACTO AMBIENTAL DE LA DANA

En la actualidad, la frecuencia e intensidad de fenómenos meteorológicos extremos, como las Depresiones Aisladas en Niveles Altos (DANAs), han aumentado a nivel global, destacando especialmente la región mediterránea. Este incremento está directamente relacionado con la actividad humana y el calentamiento global generado por el cambio climático, que ha provocado un incremento en la temperatura del mar y en la humedad atmosférica. Asimismo, la modificación del territorio, a través de la expansión urbanística y la deforestación, ha reducido la capacidad natural del suelo para la absorción y drenaje del agua, intensificando la vulnerabilidad frente a episodios de precipitaciones intensas. La combinación de ambos factores hace que las DANAs representen una amenaza creciente para los ecosistemas y la sociedad, consolidándose como un importante problema ambiental.

La Depresión Aislada en Niveles Altos (DANA) es un fenómeno meteorológico que hace referencia a una depresión aislada a gran altitud, la cual se caracteriza por presentar un núcleo de aire muy frío que genera inestabilidad atmosférica (Bernardo et al., 2024). Este suceso se presenta con regularidad en la zona del Mediterráneo durante las estaciones de transición, otoño y primavera, cuando existe una gran diferencia entre la temperatura cálida del mar y el aire frío en las capas altas de la atmósfera. Este contraste de térmico puede dar lugar a episodios de lluvias intensas en superficie, concentradas en cortos periodos de tiempo y fuertes tormentas. Estos fenómenos pueden provocar inundaciones de gran magnitud y otros impactos perjudiciales para el medio ambiente, como la erosión del suelo, y la acumulación de sedimentos (Martín León, 2019).

En la figura 1 del Servicio Marítimo de Copernicus, Meteorológica, se muestra la evolución de la temperatura del mar Mediterráneo y su calentamiento progresivo desde 1986 hasta 2024. Las anomalías térmicas registradas muestran una tendencia creciente, especialmente en las últimas décadas, llegando a superar un valor de 1,38°C, por encima de la media histórica (22,6°C). Este régimen térmico elevado, influye en la aparición de las Depresiones Aisladas en Niveles Altos (DANAs) al aportar mayor carga energética al mar y favorecer condiciones de inestabilidad atmosférica.

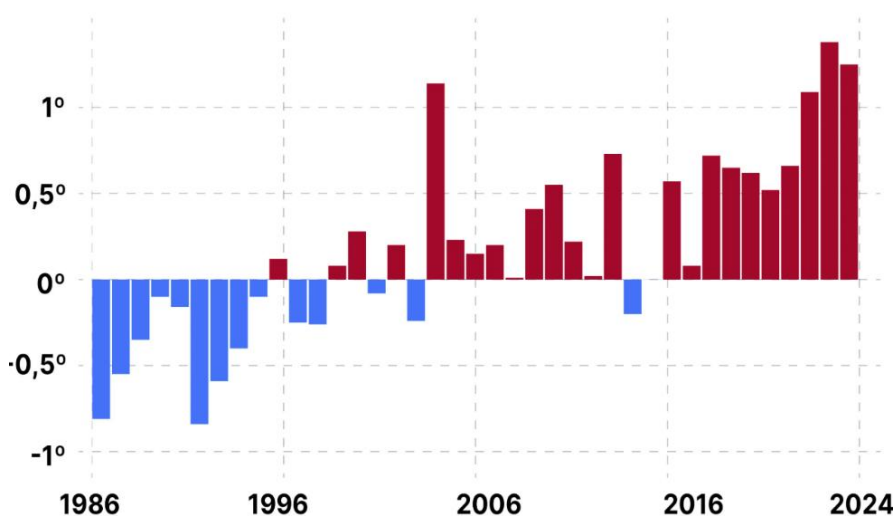


Figura 1. Temperatura media del mar Mediterráneo en los meses de junio y agosto (1986-2024). Fuente: Servicio Marítimo de Copernicus, Meteorológica

En este contexto, varios estudios respaldan la hipótesis del incremento de eventos meteorológicos extremos en la zona mediterránea. Un análisis realizado por la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET) basado en datos de estaciones del litoral mediterráneo, evidencia un aumento de lluvias extremas tanto en frecuencia como en intensidad, especialmente en los años 2015 y 2020. Estos datos están relacionados con la aparición de las DANAs junto con un fuerte aporte de humedad procedente del mar Mediterráneo (Oria Iriarte, 2021).

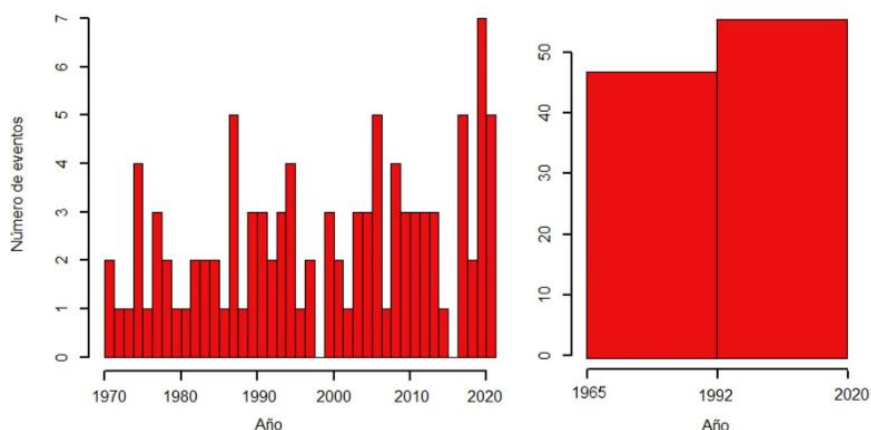


Figura 2. Evolución de las precipitaciones extremas en el litoral mediterráneo español en términos de frecuencia e intensidad (1965-2020). Fuente: Oria Iriarte, AEMET, 2001.

El litoral mediterráneo español, incluyendo la Comunidad Valenciana, presenta características geomorfológicas que condicionan su vulnerabilidad frente este tipo de fenómenos. En esta zona, existe relieve escarpado, con predominancia de cuencas pequeñas y pendientes pronunciadas que favorecen las crecidas torrenciales de rápido desarrollo (Gallegos-Reina, 2021). Por otro lado, las áreas de llanura aluvial inducen procesos de acumulación de agua y desbordamiento de cauces, acrecentado por la urbanización intensiva y la impermeabilización del suelo. Estos factores, tanto naturales como antrópicos, influyen en la vulnerabilidad ante las DANAs, lo que hace necesario desarrollar estrategias para reducir su impacto (Ruiz, 2008).

1.2 IMPACTO DE LA DANA EN LA PROVINCIA DE VALENCIA

El 29 de octubre de 2024, una Depresión Aislada en Niveles Altos afectó gravemente a la Comunidad Valenciana, principalmente a la provincia de Valencia. Este fenómeno dio lugar a lluvias torrenciales e inundaciones en numerosos municipios.

Según el informe oficial de la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET, 2024), su origen data el 25 de octubre, cuando una borrasca próxima a las Islas Británicas, impulsada por un fuerte flujo de viento en altura, desplazó aire frío hacia el sur, situándose en el centro de la Península Ibérica. Esta masa de aire frío avanzó hasta el golfo de Cádiz donde interactuó con la cordillera del Atlas y el mar de Alborán, creando una presión baja que impulsó gran cantidad de humedad desde el Mediterráneo hacia la costa este.

Posteriormente, la DANA evolucionó a una borrasca fría aislada, lo que favoreció las bajas presiones en superficie y viento húmedo constante sobre la zona mediterránea. Como resultado, se desarrollaron numerosas tormentas intensas que produjeron precipitaciones torrenciales continuas en la provincia de Valencia y otros municipios de la comarca de l'Horta Sud, causando graves inundaciones.

En la figura 3 del informe de AEMET, se observan imágenes captadas por radares meteorológicos de Valencia, a la izquierda, y Almería, a la derecha, el día 29 de octubre. Se presentan estructuras convectivas, con tormentas que se desplazaban de forma repetitiva sobre las mismas áreas, afectando al interior de la provincia de Valencia, y el sur de la provincia de Albacete. Estas tormentas formaban parte de los Sistemas Convectivos de Mesoescala (SCM), que indujeron las precipitaciones intensas registradas.

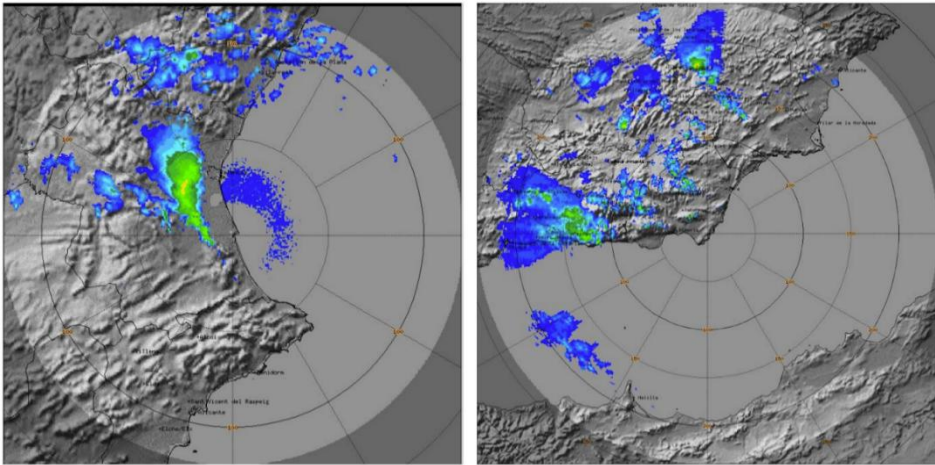


Figura 3. Sistemas Convectivos de Mesoescala (SCM) organizadas en tren convectivo en el sureste peninsular. Fuente: Informe AEMET

Durante el episodio, se dieron condiciones climáticas extremas en la península ibérica. El mes de octubre fue el mes más lluvioso registrado en la serie histórica de España desde 1961, con una media nacional de 147 l/m², lo que supone casi el doble de la precipitación normal para este mes (AEMET, 2024). El 29 de octubre se registraron 771 l/m² en 24 horas en la localidad de Turís, de los cuales 185 l/m² cayeron en el intervalo de una hora.

Tabla 1. Valores de lluvia acumulada (l/m²) en estaciones meteorológicas valencianas el 29 de octubre de 2024.

Estación	Máximo en 1h (l/m ²)	Máximo en 12 h (l/m ²)	Precipitación acumulada en 24 h (l/m ²)
Turís	185	720	772
Utiel, la Cubera	43	217	243
Carcaixent	45	132	140
Baix	48	106	119
Bicorp	38	66	67
Llíria	28	58	65

Tal como se observa en la tabla 1, la estación de Turís registró en tan solo una hora 185 l/m², un valor que supera la media de precipitación mensual de octubre en España. Así pues, se refleja la intensidad del evento meteorológico en la provincia valenciana. El resto de las estaciones de Valencia también presentan precipitaciones importantes, aunque solo Utiel alcanzó acumulaciones cercanas a las de Turís.

Tras la tabla de valores, se incluye una representación gráfica de la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET), que presenta la precipitación acumulada el día de la DANA (figura 4). En ella se observa el episodio de lluvias en el área central de la provincia, abarcando municipios como Turís, Chiva, Utiel, Montroi y Catadau, con acumulaciones superiores a los 300 l/m², superando el máximo en Turís.

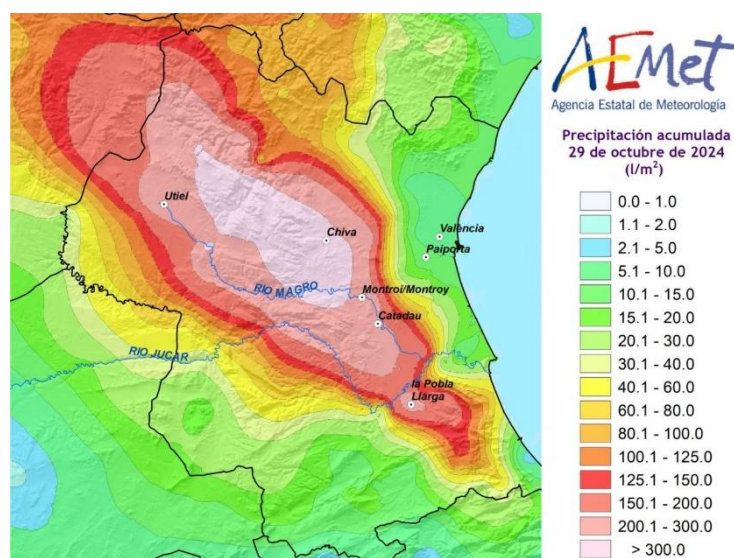


Figura 4. Representación cartográfica de la precipitación acumuladas en la provincia de Valencia el 29 de octubre de 2024. Fuente: Agencia Estatal de Meteorología

Estas precipitaciones excepcionales durante la DANA produjeron varios desbordamientos de cauces, como el río Magro, Júcar y Turia, así como de barrancos en la provincia de Valencia, agravando el impacto de las inundaciones. Entre ellos destaca el barranco del Poyo, de 40 km de longitud, desde su origen en las montañas de Chiva hasta su desembocadura en la Albufera, alcanzó caudales superiores a los 2000 m³/s en Ribarroja. Este rápido aumento en el volumen del caudal generó inundaciones en localidades aguas abajo como Massanassa, área central de este trabajo.

En la figura 5, se presenta el gráfico del caudal del barranco del Poyo, con la evolución del volumen durante el episodio de DANA. La representación ha sido elaborada por los datos ofrecidos por la Confederación Hidrográfica del Júcar.

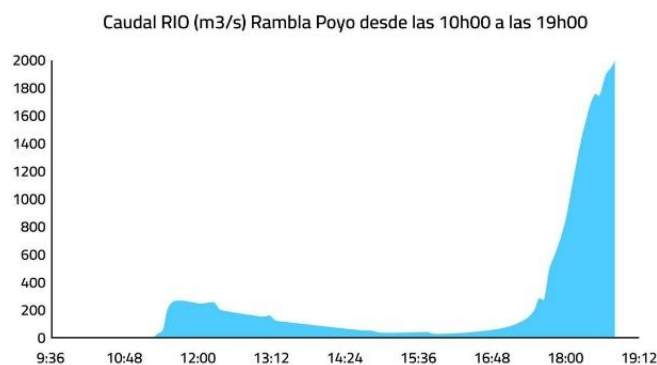


Figura 5. Caudal (m³/s) acumulado por hora la DANA de Valencia. Fuente: Confederación Hidrográfica del Júcar

Otros barrancos, como el de la Saleta, también sufrieron desbordamientos importantes, afectando a poblaciones como Aldaia. En la cuenca del río Magro, el incremento del caudal impactó a localidades como Utiel y Algemesí, entre otros. Asimismo, el río Turia también experimentó avenidas, pero más moderadas por el control de sus embalses, sin embargo, se produjeron vertidos que afectaron al Sot de Chera.

Por otro lado, las temperaturas durante este mes fueron superiores a la media histórica, con una temperatura media mayor al 0,9°C del promedio habitual, favoreciendo la persistencia de inestabilidad atmosférica y los fenómenos asociados a la DANA. En concreto, octubre de 2024 fue un mes húmedo y cálido en la Comunidad Valenciana,

con una temperatura media de 17,8°C, 1,2°C por encima de la media climatológica de referencia (16,6°C). Durante gran parte del mes, las temperaturas fueron elevadas respecto al valor medio, a excepción de los días 26 y 27, donde la DANA y su flujo de aire frío se situaron en el área valenciana, dando lugar al día más frío del mes, el 27 de octubre.

De acuerdo con el documento de Avance climático de la Agencia Estatal de Meteorología (AEMET, 2024), en la figura 6 se presenta la evolución de la temperatura media diaria en la Comunidad Valenciana durante el mes del evento climático, en periodo 1991-2024.

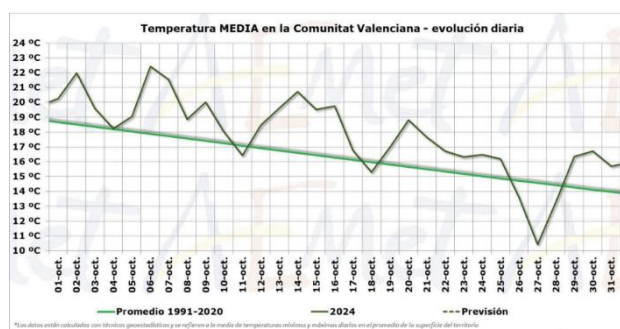


Figura 6. Evolución diaria de la temperatura media en la Comunidad Valenciana. Fuente: Agencia Estatal Meteorología (AEMET)

Finalmente, la Depresión Aislada en Niveles Altos (DANA) de 2024, afectó a un total de 75 municipios en la provincia de Valencia, incluyendo localidades como Chiva, Paiporta, Catarroja y Massanassa, entre otros. Aproximadamente, se estima que 1,1 millones de habitantes fueron afectados por este evento meteorológico, de un total de 5,3 millones de habitantes en la Comunidad Valenciana.

En la figura 7, se muestra un mapa elaborado a partir del visor cartográfico de zonas inundadas de la Generalitat Valenciana (GVA), en el que se representan los municipios afectados por la DANA y las áreas que se vieron afectadas por las inundaciones.

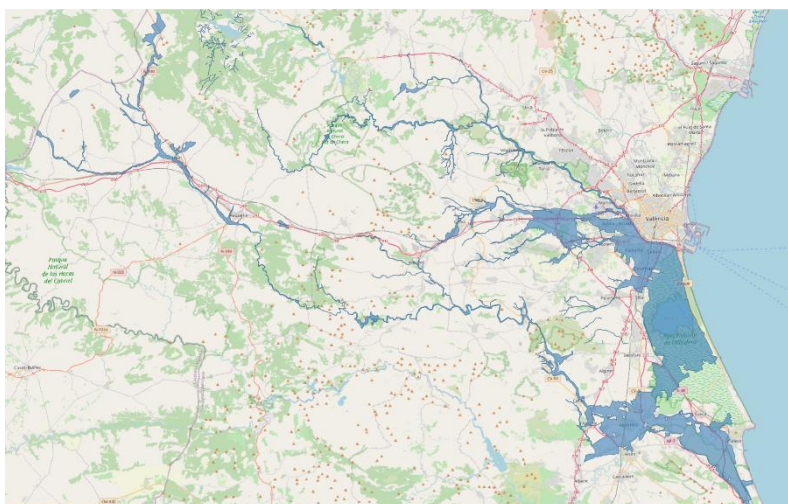


Figura 7. Municipios afectados por la DANA de octubre de 2024 en la provincia de Valencia y sus zonas inundadas. Representación propia a partir del visor cartográfico de zonas inundadas de la Generalitat Valenciana (GVA).

1.3 CONTAMINACIÓN Y RIESGOS ASOCIADOS A LOS SEDIMENTOS

La EPA (Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos) define los sedimentos como materiales acumulados en el fondo de masas de agua, como arcilla, limo o materia orgánica, que pueden contaminarse por múltiples vías, incluyendo escorrentía urbana, agrícola e industrial, vertidos, contaminación atmosférica y aguas subterráneas contaminadas. Estos sedimentos potencialmente contaminados representan un riesgo tanto para la salud humana como para los ecosistemas. (EPA, 2025).

Durante la DANA de octubre de 2024, las precipitaciones extremas dieron lugar a crecidas en barrancos y ríos, provocando el desbordamiento de diversos cauces, entre ellos el barranco del Poyo, el barranco de Chiva y el barranco de la Saleta. Como consecuencia, se movilizaron y redistribuyeron sedimentos acumulados en el lecho de los cauces, naturales y artificiales, así como otras sustancias procedentes de zonas húmedas y otros ecosistemas. Además, la escorrentía superficial originada por el desbordamiento atravesó áreas urbanas, naturales y agrícolas de los municipios afectados, incorporando una mayor carga contaminante al agua.

Asimismo, el Parque Natural de la Albufera está conectada con diversas cuencas y barrancos que desembocan en ella, a través de sistema de acequias y canales que recogen tanto aguas superficiales como de escorrentía. Las crecidas arrastraron gran cantidad de sedimentos, materia orgánica y contaminantes que alcanzaron estas infraestructuras hídricas hasta llegar al Parque Natural. Como resultado, se alteró la calidad del agua, afectando a procesos naturales que influyeron en la flora y fauna presente. (Demarcación Hidrográfica del Júcar, 2025).

- **TOXICIDAD DE LOS SEDIMENTOS MOVILIZADOS**

La movilización de sedimentos inducida por las escorrentías y la saturación de infraestructuras urbanas, industriales e hidráulicas favoreció la dispersión de lodos posiblemente contaminados, generando un impacto ambiental desfavorable.

Durante la DANA de octubre de 2024, la toxicidad potencial de los sedimentos está relacionada su recorrido, incorporando sustancias de diferentes fuentes de contaminación. La toxicidad dependiendo de su origen proporciona características específicas que intensifican el riesgo ambiental (Demarcación Hidrográfica del Júcar, 2025).

Según el documento técnico “*Plan para la recuperación y mejora de la resiliencia frente a las inundaciones en el territorio afectado por la DANA en la Comunidad Valenciana*” realizado por la Demarcación Hidrográfica del Júcar, se identificaron las siguientes fuentes:

- a) Áreas Industriales y Urbanas**

La entrada de escorrentía en polígonos industriales y áreas asociadas provocó el lavado de polvos industriales, hidrocarburos, aceites, metales pesados (Pb, Cd, Cu, Zn) y otros residuos, que fueron transportados a través del alcantarillado o directamente a cauces naturales.

La acumulación de lodos en núcleos urbanos afectó alrededor de 1.200 bajos y garajes. Se registraron problemas de colmatación de los colectores en 52 municipios, de forma que los lodos y residuos arrastraron obstruyeron las calles, viviendas y comercios. De esta forma, los sedimentos contaminantes presentes en sótanos, garajes y otras áreas subterráneas propiciaron condiciones anaeróbicas, favoreciendo la formación gases tóxicos como sulfuros, o la movilización de metales pesados (Hg, As) pudiendo incrementar el riesgo ambiental por toxicidad.

En la figura 8, se muestra un mapa con las zonas industriales (en rojo) que coinciden espacialmente con las áreas afectadas por la DANA de octubre de 2024 (en azul). Esta representación ha sido elaborada a partir de la capa Corine Land Cover 2018 del visor cartográfico de la Generalitat Valenciana.

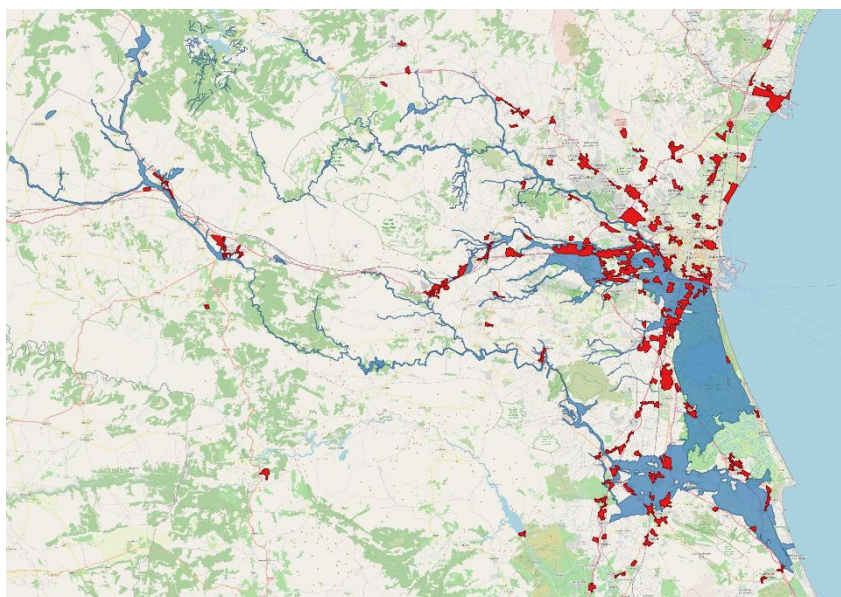


Figura 8. Representación cartográfica de las zonas industriales en las áreas inundadas por la DANA en Valencia

b) Redes de Saneamiento y Depuración

La Red de Saneamiento y depuración también fue gravemente afectada, y se estima que un total de 123 estaciones depuradoras de aguas residuales (EDAR) fueron afectadas. El colapso en el funcionamiento de las estaciones depuradoras dio lugar a vertidos de aguas residuales sin tratar correctamente hacia barrancos y canales, incrementando su carga en materia orgánica, nutrientes y otros microorganismos patógenos. Los vertidos a la red de saneamiento facilitaron el traslado de vertidos con sustancias potencialmente tóxicas hacia los cauces, como el barranco del Poyo.

Según informes presentados en enero de 2025 por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), los sedimentos recogidos en el barranco del Poyo y otros afluentes de la Albufera presentaban contaminación microbiológica.

La recuperación fue progresiva, y en enero de 2025 la Entidad Pública de Saneamiento de Aguas Residuales (EPSAR) informó de la recuperación total de las EDAR afectadas en la DANA.

c) Presas e Infraestructuras hidráulicas

Durante el fenómeno meteorológico varios embalses y otras infraestructuras de regulación presentaron incidencias por el exceso de caudal. La escorrentía durante la DANA afectó de forma directa a dos presas, Forata y Buseo.

En la presa de Forata, se activó el Plan de Emergencia para disminuir su caudal aguas abajo. Sin embargo, estos sedimentos se acumularon en la toma de agua y desagüe, dando lugar a metros de espesor de contaminantes urbanos, agrícolas e industriales en el agua almacenada.

En la presa de Buseo, gestionada por la Generalitat Valenciana, el agua se desbordó superficialmente aguas abajo, liberando sedimentos contaminantes que afectaron a la calidad del agua superficial y su carga de contaminantes.

1.4 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AMBIENTAL CON *P. LIVIDUS* Y *A. FRANCISCANA*

Los ensayos de toxicidad aguda con organismos modelo como *Paracentrotus lividus* y *Artemia franciscana*, son ampliamente utilizados para evaluar el impacto de contaminantes ambientales en el medio ambiente.

• ENSAYOS CON ARTEMIA FRANCISCANA

Artemia franciscana es un organismo modelo utilizado en evaluaciones toxicológicas debido a su sensibilidad ante contaminantes presentes en el medio ambiente marino. Algunos de los criterios que hacen a *A. franciscana* relevante en estos estudios son:

- A) **Disponibilidad y Accesibilidad:** Los quistes de *A. franciscana* pueden adquirirse fácilmente de forma comercial, y eclosionar bajo condiciones de laboratorio normales en un periodo de entre 24 a 48 horas, asegurando la homogeneidad de la población y disponibilidad continua (Manfra et al., 2015). Además, el conocimiento biológico y ecológico amplio de esta especie, su fácil uso, mantenimiento y adaptabilidad a diversas condiciones experimentales, representan ventajas importantes para la realización de estudios (USEPA, 2002).
- B) **Sensibilidad:** Numerosos protocolos de pruebas de toxicidad reflejan la tasa de mortalidad y eclosión en función de la presencia de contaminantes, incluso en concentraciones bajas (Migliore et al., 1997; Sarabia et al., 2008; Garaventa et al., 2010). Por otro lado, también se ha declarado que el criterio de supervivencia es el de valoración más sensible en comparación con el crecimiento y reproducción (Brix et al., 2003; Savorelli et al., 2007; Manfra et al., 2015).
- C) **Ciclo de vida y desarrollo:** Estos crustáceos marinos presentan un ciclo de vida con estadios larvales bien definidos. Tras la eclosión, los nauplios alcanzan la etapa de madurez entre 12 y 20 días, lo que permite la obtención de resultados en periodos cortos (Gaspar Reyes et al., 2021).
- D) **Ensayos de Toxicidad y validación de la comunidad científica:** Existen en la actualidad protocolos ecotoxicológicos con *A. franciscana* que evalúan este parámetro a través de mortalidad aguda, prueba de eclosión aguda y mortalidad a largo plazo. Estos permiten evaluar diferentes efectos en función del contaminante y periodo de exposición, además de demostrar reproducibilidad de los resultados (Libralato, 2014; Manfra et al., 2015).

• ENSAYO CON PARACENTROTUS LIVIDUS

El uso de *Paracentrotus lividus* en los bioensayos, mediante la exposición de huevos y embriones, se ha consolidado como un indicador eficaz para evaluar la toxicidad de los sedimentos en el ámbito oceánico (Beiras et al., 2003; Volpi Ghirardini et al., 2005). Los aspectos más relevantes que *P. lividus* aporta a los ensayos toxicológicos son:

- A) **Alta sensibilidad embrionaria:** Los embriones de *P. lividus* presentan una sensibilidad significativamente mayor frente a efectos tóxicos, dando lugar a retrasos o interrupción en el crecimiento. Debido a que *P. lividus* presenta etapas embrionarias diferenciadas, la respuesta ante contaminantes se ve reflejada en las distintas fases. Estas anomalías morfológicas permiten identificar la presencia de

sustancias tóxicas en concentraciones bajas o mínimas con mayor eficacia que otro tipo de ensayos (Khosrovyan et al., 2003; Beiras et al., 2003).

- B) **Integración de ensayos de toxicidad:** El organismo modelo permite realizar ensayos agudos, mediante la fertilización de los oocitos, y ensayos crónicos, a través del desarrollo embrionario, para caracterizar el grado de toxicidad de sedimentos. Ambos métodos proporcionan información sobre el impacto en *P. lividus*, permitiendo combinar ambos ensayos para obtener una evaluación más completa del efecto.
- C) **Distribución Geográfica y sus adaptaciones:** *Paracentrotus lividus* se distribuye por el Mar Mediterráneo y la costa noreste del Atlántico, lo que facilita su muestreo (Espino et al., 2006). Por otro lado, su capacidad de adaptación al oleaje y su resistencia ante condiciones cambiantes, favorecen su supervivencia en el laboratorio, permitiendo la obtención de resultados fiables y reproducibles (Boudouresque y Verlaque, 2001).

2.OBJETIVOS

En ese estudio se plantea evaluar el grado de toxicidad presente en muestras de sedimentos recogidas en distintos puntos del municipio de Massanassa tras un episodio meteorológico de Depresión Aislada en Niveles Altos (DANA). Para ello, se realizan test de toxicidad aguda con dos organismos bioindicadores, *Artemia franciscana* y *Paracentrotus lividus*, con la finalidad de identificar el posible impacto ambiental adverso asociado a su movilización y deposición en el medio ambiente.

Los objetivos específicos del estudio son los siguientes:

- Realizar la caracterización fisicoquímica de las muestras de sedimentos para identificar sus propiedades y establecer posibles correlaciones entre estas y los resultados de toxicidad observados en los bioensayos.
- Evaluar el potencial tóxico tras la exposición a las muestras de sedimentos de la DANA en *P. lividus*, utilizando como criterio toxicológico la afectación al desarrollo y crecimiento embrionario de esta especie.
- Evaluar el potencial tóxico tras la exposición aguda a las muestras de sedimentos de la DANA en *A. franciscana*, utilizando como criterio toxicológico la mortalidad larvaria en los bioensayos de exposición aguda.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. MUESTREO DE SEDIMENTOS EN EL MUNICIPIO DE MASSANASSA

El área de estudio se ubica en el término municipal de Massanassa, en la provincia de Valencia, dentro de la Comunidad Valenciana (39°24'42"N 0°23'58"W).

La selección de las seis zonas de muestreo de sedimentos tras la DANA se realiza con el objetivo de establecer un gradiente espacial, es decir, estableciendo los puntos de muestreo desde la zona más próxima al origen del flujo del agua hasta la zona más alejada, finalizando en un área de uso industrial. De esta forma, se evalúan los efectos tóxicos y su variación respecto a la concentración de contaminantes a lo largo del recorrido del agua en el término municipal de Massanassa.

En la figura 9, se muestra una representación geográfica del municipio de Massanassa con los puntos concretos de muestreo donde se recogieron los sedimentos de la DANA.

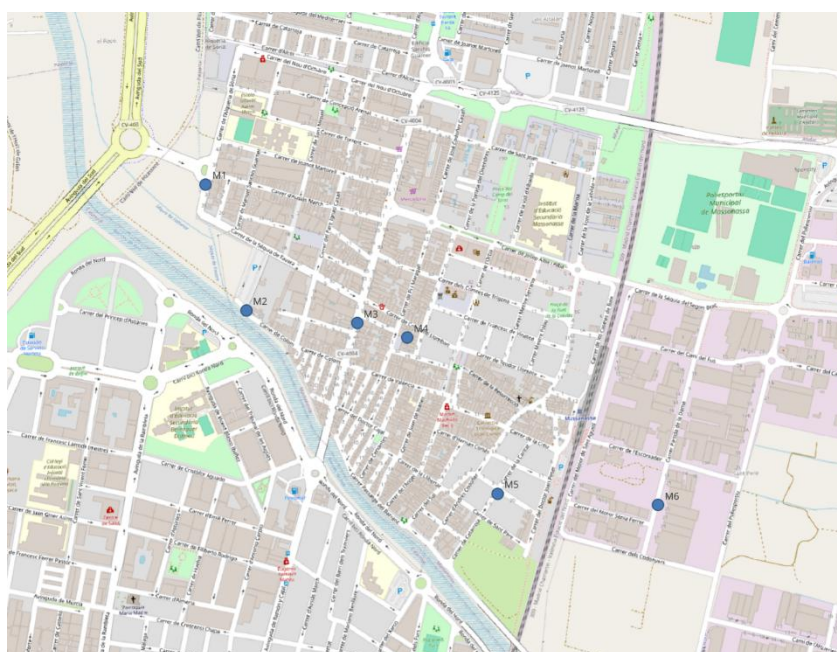


Figura 9. Puntos de muestreo dentro del término municipal de Massanassa

3.1.1 PUNTOS DE MUESTREO

La realización del procedimiento de muestreo tuvo lugar el 27 de noviembre de 2024, en un intervalo de aproximadamente de 3 horas, desde las 11:00 hasta las 13:46.

Para la recolección de las muestras de sedimento, se utilizaron seis botes de capacidad de 1 litro, uno por cada punto de muestreo, y una pala. Durante el proceso se utilizó un traje completo EPI, con mascarilla FFP2, guantes, gafas de seguridad y botas impermeables. Los botes fueron rotulados según el punto de muestreo correspondiente y transportados al laboratorio, donde las muestras se conservaron congeladas a -20°C hasta el momento de análisis.

- P1: ENTRADA AL MUNICIPIO DE MASSANASSA (Rotonda V-31)

El primer punto (39°24'48"N 0°24'13"W) se ubica en las proximidades de la rotonda de entrada al municipio de Massanassa, desde la carretera V-31. El flujo de agua que entró por el fenómeno climático procedía del suroeste, directamente del barranco del Poyo que desciende desde Chiva y Torrent. El cauce del barranco en el tramo de Catarroja y

Massanassa se desbordó por el exceso de escorrentía, llegando hasta la rotonda con acumulación de sedimentos, contaminantes y su consiguiente flujo de agua.

La elección de este punto tiene como finalidad representar uno de los lugares iniciales en los que la corriente tuvo contacto con el terreno de Massanassa, antes de atravesar zonas más contaminadas.



Figura 10. Localización del primer punto de muestreo en la entrada de Massanassa

- P2: BARRANCO DEL POYO

El siguiente punto de muestreo ($39^{\circ}24'40''\text{N}$ $0^{\circ}24'10''\text{W}$) se localiza dentro del área urbana de Massanassa, en una zona accesible del barranco del Poyo, donde la muestra fue tomada directamente desde el lecho. Esta ubicación refleja la continuidad natural del flujo de agua, desde la entrada al municipio hacia el interior, donde el agua ha recorrido mayor distancia y puede incorporar en su masa sedimentos y contaminantes. Este punto es seleccionado por la representación directa del transporte del flujo dentro del cauce del barranco.



Figura 11. Localización del segundo punto de muestreo en el Barranco del Poyo

- P.3: APARCAMIENTO SUBTERRÁNEO EN AV. BLASCO IBÁÑEZ

El tercer punto de muestreo ($39^{\circ}24'39''\text{N}$ $0^{\circ}24'01''\text{W}$) se localiza en el interior de un aparcamiento subterráneo de un edificio residencial en la Avenida Blasco Ibáñez, en Massanassa, el cual fue inundado durante la DANA. Tras el descenso y retirada del agua juntamente con los vehículos, la muestra se recogió directamente del fango de los niveles inferiores del aparcamiento.

La selección de este punto es relevante para analizar el flujo de agua ya dentro del núcleo urbano de Massanassa, donde la escorrentía del agua lleva mayor cantidad de sedimentos, y su posible carga adicional por los contaminantes procedentes de los vehículos afectados (aceites, metales, hidrocarburos, etc.); Su ubicación también permite comparar las afectaciones en espacios cerrados urbanizados y espacios abiertos.

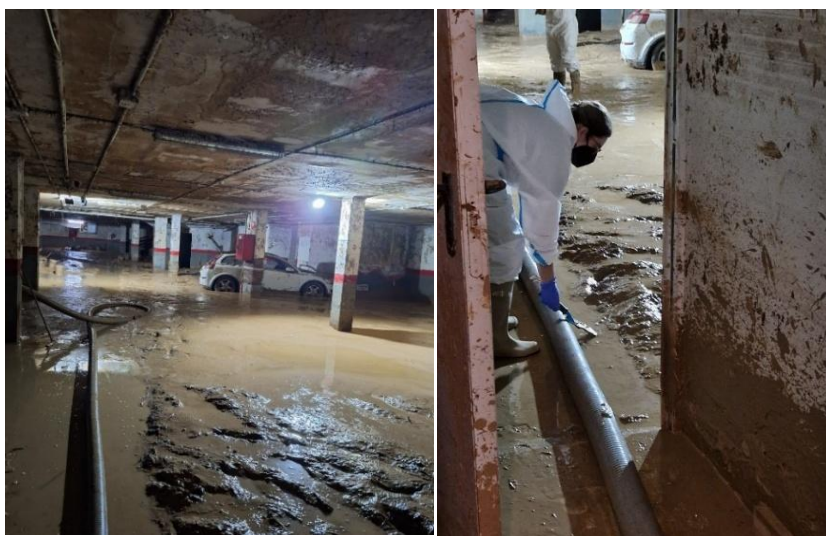


Figura 12. Localización del tercer punto de muestreo en aparcamiento particular en Massanassa

- P4: PATIO EXTERIOR DE VIVIENDA EN CALLE VALENCIA

El cuarto punto de muestreo ($39^{\circ}24'38''\text{N}$ $0^{\circ}23'57''\text{W}$) se encuentra en una propiedad residencial de planta baja situada en el interior del término municipal, concretamente en la C/Valencia, próxima al barranco del Poyo. Esta vivienda cuenta con un patio exterior ajardinado con presencia de suelo con abono orgánico, un árbol cítrico (*Citrus limon* (L.) Osbeck) y diversas plantas florales y decorativas.

Esta vivienda fue afectada por el evento meteorológico, inundando tanto el interior como el patio exterior. La muestra fue recogida al descender el nivel del agua, directamente del suelo del jardín. Este punto refleja la acumulación y composición de sedimentos y contaminantes transportados por la escorrentía superficial en una zona más interna de Massanassa, permitiendo conocer la variación en los niveles de contaminación desde áreas periféricas hacia el núcleo urbano.



Figura 13. Localización del cuarto punto de muestreo en vivienda unifamiliar con patio exterior en Massanassa

- P5: APARCAMIENTO JUNTO AL FINAL DEL BARRANCO DEL POYO

El siguiente punto de muestreo ($39^{\circ}24'28''N$ $0^{\circ}23'50''W$) se localiza en un aparcamiento exterior, próximo al final del tramo del barranco del Poyo que corresponde al término municipal de Massanassa. Esta zona representa el límite del núcleo urbano, marcando un área de transición entre el entorno residencial y la zona industrial del municipio. Este aparcamiento fue afectado durante el evento meteorológico, tanto por la escorrentía superficial como por el desbordamiento directo del barranco, generando una zona de acumulación y deposición de fango y otros contaminantes. La toma de muestra fue recogida de este material sedimentado en el suelo.

Este punto representa una zona de acumulación de sedimentos potencialmente contaminantes tras su transporte a lo largo del núcleo urbano. De esta forma, permite conocer la composición final y su correspondiente carga de contaminación, reflejando el impacto de todas las fuentes presentes en el municipio.



Figura 14. Localización del quinto punto de muestreo en aparcamiento exterior en Massanassa

- P6: ÁREA INDUSTRIAL EN HERBOLARIO NAVARRO

El último punto de muestreo (39°24'27"N 0°23'37"W) completa el gradiente de toxicidad establecido en este estudio, y se ubica en la zona industrial de Massanassa, concretamente frente a la empresa "Herbolario Navarro" y próxima a las vías del tren. La muestra fue recogida del material depositado sobre el pavimento de la fachada de esta empresa. Esta localización presenta una cota más baja respecto al resto de puntos de muestreo, debido a la pendiente natural del terreno y el descenso del barranco del Poyo hacia el este, favoreciendo la acumulación de escorrentía superficial.

Este punto refleja en su totalidad la carga final de sedimentos potencialmente contaminantes tras su transporte a lo largo del municipio, incluyendo los aportes de fuentes industriales y urbanas propias de esta zona. Por lo tanto, permite analizar el impacto acumulado de todas fuentes de contaminación presentes en Massanassa.



Figura 15. Localización del sexto punto de muestreo en zona industrial "Herbolario Navarro" en Massanassa

Finalmente, tras la recolección de las seis muestras de sedimento, se preservaron congeladas en el laboratorio hasta el momento de realizar la caracterización fisicoquímica y los bioensayos correspondientes.

3.2 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA DE LOS SEDIMENTOS

Previamente a la realización de los bioensayos con *Artemia franciscana* y *Paracentrotus lividus*, se lleva a cabo la caracterización fisicoquímica de las seis muestras de sedimento objeto de estudio.

La finalidad de este análisis es conocer las condiciones de los sedimentos una vez finalizado el episodio de lluvias intensas, concretamente su composición, estado, propiedades fisicoquímicas y posibles fuentes de contaminación. Esta información permite comprender la relación de estas características y los resultados biológicos que se obtengan en los ensayos.

Los parámetros por determinar son el porcentaje en humedad, materia orgánica, pH y conductividad eléctrica.

Antes del comienzo de la caracterización, las muestras de sedimentos fueron descongeladas durante 24h a temperatura ambiente, homogenizadas y divididas en alícuotas para cada proceso específico.

3.2.1 MEDICIÓN DE LA HUMEDAD

El contenido en humedad de las muestras de sedimento se determina a través del análisis gravimétrico, aplicando el procedimiento descrito en el método 2540G para el análisis de muestras sólidas y semisólidas (APHA, AWWA, & WEF, 2017).

Previamente al comienzo del procedimiento, el crisol a utilizar se calienta en una estufa a 100°C, y después se dejó atemperar.

Seguidamente, se pesa un crisol seco y limpio, al que se añade una cantidad conocida de muestra húmeda, aproximadamente 50 g, para obtener el peso total. Seguidamente, la muestra se somete a secado en estufa a 105°C hasta peso constante, y se enfría en desecador. Finalmente, se pesa nuevamente para obtener el valor del peso seco y se calcula el porcentaje de humedad presente en las muestras con la fórmula:

$$H = \frac{(P2 - P3)}{(P2 - P1)} \times 100$$

Siendo:

P1= Peso del crisol limpio y seco (g)

P2= Peso del crisol con muestra húmeda (g)

P3= Peso del crisol con muestra seca (g)

3.2.2 DETERMINACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA

Para evaluar el contenido de materia orgánica de las muestras, se utiliza el método de pérdida por calcinación (Loss on Ignition, LOI), empleando el procedimiento del método 2540G para el análisis de sólidos fijos y volátiles (APHA, AWWA, & WEF, 2017).

Para su determinación, se utilizan las muestras secas obtenidas durante el análisis de la humedad. Las muestras se introducen en un horno mufla y se calcinan a 550°C durante un periodo de 4 horas. Transcurrido este tiempo, se deja enfriar en un desecador y se pesan para obtener el peso final. El porcentaje de materia orgánica se calcula con la fórmula siguiente:

$$MO = \frac{(P3 - P4)}{(P3 - P1)} \times 100$$

Siendo:

P1 = Peso del crisol limpio y seco (g)

P3 = Peso del crisol con muestra seca antes del proceso de calcinación (g)

P4 = Peso del crisol con la muestra calcinada (g)

3.2.3 MEDICIÓN DEL pH

En la determinación del pH de las muestras de sedimento se utiliza la medición en suspensión acuosa, siguiendo el método 4500-H⁺, establecido para la valoración del pH (APHA, AWWA, & WEF, 2017).

Inicialmente, se pesan 10 gramos de cada muestra y se adicionan 25 mL de agua destilada en un vaso de precipitados. A continuación, se dispone en un agitador durante un periodo de 30 minutos. Finalmente, se mide la variable con un pH-metro previamente calibrado con las soluciones buffer correspondientes.

3.2.4 MEDICIÓN DE LA CONDUCTIVIDAD ELÉCTRICA

En cuanto a la determinación de la conductividad eléctrica de las muestras, se realiza a través de la medición en suspensión acuosa, de acuerdo con el método 2510 para establecer la conductividad (APHA, AWWA, & WEF, 2017).

El primer paso es el pesaje de 10 gramos de las muestras de sedimento, a los cuales se adicionan 50 mL de agua destilada en un vaso de precipitados, seguidamente se dispone en agitador durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo, se mide la conductividad mediante un conductímetro calibrado previamente con estándares de referencia.

3.3. FUNDAMENTOS DE LOS BIOENSAYOS UTILIZADOS

Para la evaluación de toxicidad de este estudio, se han aplicado protocolos, procedimientos y métodos específicos para ambas especies analizadas en los bioensayos, *Artemia franciscana* y *Paracentrotus lividus*. La selección de estas dos especies indicadoras permite evaluar los posibles efectos adversos de los sedimentos sobre las etapas de desarrollo biológico.

En primer lugar, para la prueba de toxicidad con *A. franciscana* se ha seguido el documento científico publicado por la Agencia de Protección Ambiental de los EE. UU (EPA,2002) “Métodos para medir la toxicidad aguda de efluentes y aguas receptoras para organismos de agua dulce y marinos”; y el protocolo estandarizado Artoxkit M™ “*Artemia toxicity screening test for estuarine and marine waters*” de MicroBio Tests Inc (s.f).

La metodología aplicada consiste en la exposición de los nauplios, las larvas eclosionadas de *A. franciscana*, a diferentes elutriados preparados a partir de los sedimentos recogidos, durante un periodo de 48 horas. Finalizado este tiempo, se determina la toxicidad aguda en función del porcentaje de mortalidad observado en cada una de las placas, y se evalúa el grado de toxicidad de las muestras mediante la comparación de estos resultados con los obtenidos del control.

Por otro lado, en la metodología empleada en el bioensayo de *P. Lividus* se ha utilizado de la revista de investigación marina “Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck,1816)” (Garmendia, Menchaca, Belzunce y Revilla, 2009); y “Toxicidad de plásticos procedentes del mar mediante bioensayos con *Paracentrotus lividus*” (Soms Molina, 2021), trabajo de fin de Máster, Universidad Politécnica de Valencia.

El ensayo se basa en la exposición de los huevos fertilizados de *P. lividus* a diferentes elutriados preparados con los sedimentos muestreados, durante un periodo de 48 horas. Finalizado este tiempo, se examina el desarrollo larvario para determinar la toxicidad de las muestras, comparando el porcentaje de larvas que presentan un desarrollo adecuado en cada caso con el porcentaje observado en el control.

3.4 ELABORACIÓN DEL ELUTRIADO DE LOS SEDIMENTOS

En los bioensayos toxicológicos de las dos especies bioindicadoras *Paracentrotus lividus* y *Artemia franciscana*, es necesaria la realización del elutriado de las muestras de fango objeto de estudio. Este proceso permite obtener la representación de los posibles contaminantes disponibles de las muestras en una fracción líquida marina que pueda utilizarse en las pruebas de toxicidad para ambos organismos.

Para la preparación del elutriado de las muestras de sedimento, se ha seguido el procedimiento del *Protocolo de toxicidad para sedimentos marinos* desarrollado para larvas de *Paracentrotus lividus* (Garmendia et al., 2009). Este protocolo es aplicable para bioensayos con *Artemia franciscana*, debido a que las condiciones de evaluación de toxicidad en ambos bioindicadores son similares y compatibles.

El método requiere el uso de agua de mar natural, que fue recogida previamente durante el muestreo para el bioensayo de *P. lividus*. Posteriormente, esta fue filtrada en el laboratorio con el fin de evitar contaminación externa que pudiera interferir en los resultados. Para la filtración, se utiliza un sistema de vacío formado por un embudo magnético, un filtro de acetato de celulosa de 0,45 μm y un matraz de succión tipo kitasato, conectados a través de un tapón de ajuste hermético (figura 16). De esta forma, se eliminan las partículas en suspensión y contaminantes potenciales.

De este proceso se obtuvieron 3 litros de agua limpia para el elutriado de *A. franciscana*, y se reservó el agua excedente para su uso en el bioensayo con *P. lividus*.



Figura 16. Equipo de succión para filtración de agua de mar utilizada en bioensayo con *P. lividus*.

Así pues, se lleva a cabo el elutriado tomando 100 gramos de sedimento de cada muestra y se disponen en una serie de recipientes rotulados de 500 mL de capacidad (figura 17).

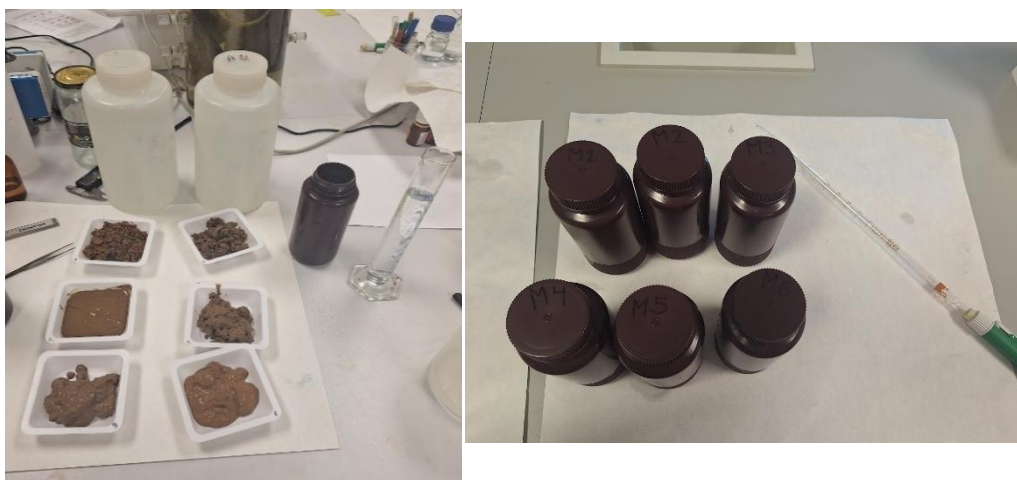


Figura 17. Preparación de submuestras de sedimentos preparadas para el protocolo de elutriado.

A continuación, se adicionan aproximadamente 400 mL de agua de mar filtrada, con salinidad comprendida entre 33 y 36 PSU, hasta alcanzar el rebose del envase.

Los recipientes se depositan en un agitador durante un periodo de 30 minutos, a velocidad constante de 60 rpm. Finalizado este tiempo, las muestras se dejan en decantación por 12 horas a una temperatura de 20°C en refrigeración. Finalmente, se recoge el sobrenadante con pipeta de 10 mL, de forma que se evite la resuspensión del sedimento, y se trasvasa a otro recipiente limpio de igual capacidad.

3.5 BIOENSAYO CON ARTEMIA FRANCISCANA

3.5.1 PREPARACIÓN Y ECLOSIÓN

Para el comienzo del bioensayo, se realiza el cultivo de los quistes de *A. franciscana*, obtenidos a partir de la eclosión de quistes deshidratados procedentes del kit estandarizado ARTOXKIT M, de MicroBio Tests Inc. Este producto se utiliza ampliamente por su elevada tasa de eclosión en condiciones normales controladas, garantizando la obtención de nauplios viables suficientes para la realización del trabajo.

El procedimiento de eclosión de nauplios se ejecuta bajo condiciones de temperatura, aireación y salinidad controladas. Para la preparación del medio salino se simulan las condiciones del agua de mar, para ello se dispone en un vaso de precipitados el contenido de la bolsa de sal marina sintética, incluida en el kit mencionado anteriormente, y un litro de agua destilada. Seguidamente, la solución se mezcla mecánicamente en un agitador hasta completar su disolución, obteniendo la solución marina a 25 g/L, de acuerdo con las instrucciones del protocolo.

A continuación, la solución artificial se trasvasa al material instrumental, formado por un recipiente cónico con capacidad de hasta 2 litros, un aireador conectado a una bomba de aire, un termocalentador sumergible regulable, y un termómetro para controlar la temperatura óptima para la eclosión, que se establece sobre los 28°C. Próxima al artemiero, se coloca una lámpara para garantizar la iluminación continua durante todo el proceso (figura 18).



Figura 18. Montaje instrumental para la incubación y eclosión de los nauplios de *Artemia franciscana*.

Este cultivo se mantuvo durante 48 horas, en las cuales se realiza un seguimiento de las condiciones del artemiero. La temperatura se controla mediante el termocalentador, de forma que se establezca entorno los 28-30°C. La aireación actúa de forma constante para evitar la sedimentación de los nauplios. Asimismo, la iluminación también se mantuvo constante para favorecer las condiciones óptimas para la eclosión.

Finalizado este periodo, se desconecta el aireador y los nauplios se recogen en un vaso de precipitados, filtrando través de una malla de 100-150 µm para separar los nauplios de los quistes que no han eclosionado. Los nauplios no utilizados se conservaron viables y con aireación como reserva para posibles análisis adicionales o para la repetición del bioensayo. La figura 19 muestra la concentración de nauplios de *A. franciscana* recién eclosionados para la utilización en este bioensayo:



Figura 19. Nauplios de *Artemia franciscana* resultantes del proceso de eclosión tras 48 horas.

3.5.2 ENSAYO DE TOXICIDAD CON TÓXICO DE REFERENCIA EN ARTEMIA FRANCISCANA

En este estudio se emplean larvas de *Artemia franciscana* como organismo de referencia, y una solución de dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$) a una concentración de 100 mg/L como sustancia control, debido a su amplia aplicación en ensayos toxicológicos y a su toxicidad bien caracterizada.

La finalidad de realizar ensayos de toxicidad con un tóxico estándar es comprobar que el protocolo experimental utilizado sea correcto y eficaz, y que el organismo bioindicador responde adecuadamente ante sus efectos. De esta forma, permite validar el método empleado en laboratorio y comparar los resultados de manera fiable.

El ensayo se realiza de acuerdo con el protocolo descrito en el kit comercial ARTOXCKIT M™ de MicroBio Tests, para la evaluación de la toxicidad aguda del elutriado de las muestras, utilizando *Artemia franciscana* el organismo de prueba. Previamente al inicio del procedimiento, se prepara la eclosión de los quistes del crustáceo marino 48 horas antes, con el objetivo de obtener las larvas necesarias para el bioensayo, tal como se explica en el apartado 3.5.1.

Se preparan distintas soluciones, mezclando volúmenes diferentes del tóxico estándar con agua de mar limpia, filtrada con anterioridad al análisis, para obtener

concentraciones equivalentes a 100, 90, 80, 65, 50 y 0% de tóxico. Para ello, se adicionan con una pipeta automática de 1000 µl las cantidades correspondientes de ambos líquidos para adquirir un volumen final de 2 mL en cada pocillo de la placa. En la figura 20, se muestra la distribución de los volúmenes empleados:

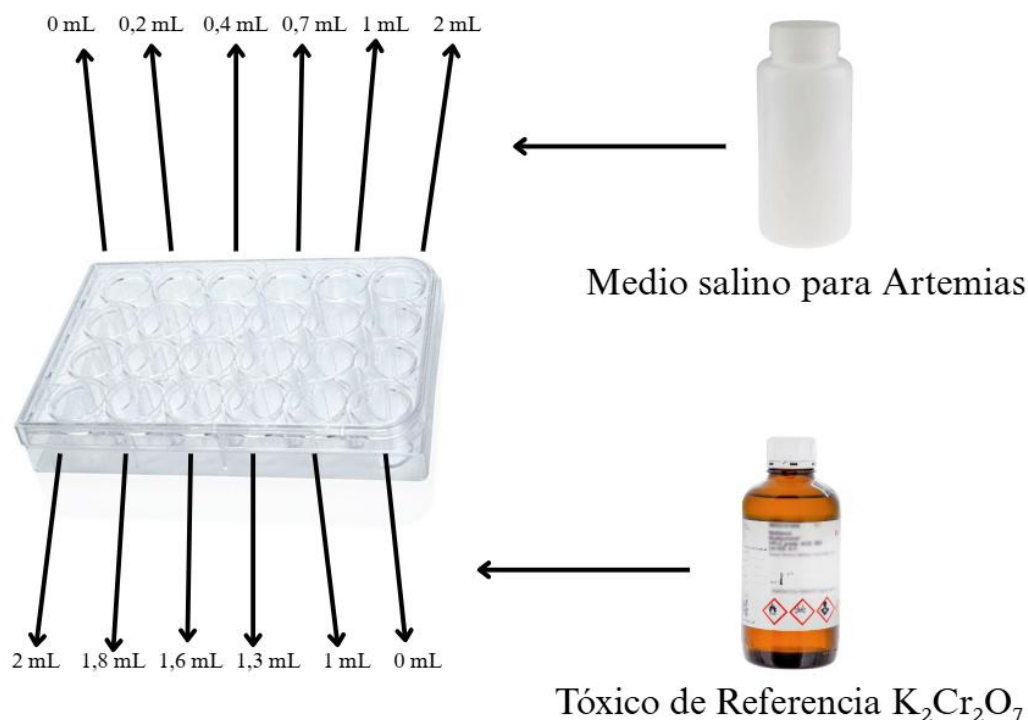


Figura 20. Esquema representativo de los volúmenes de tóxico de referencia y solución marina sintética en la placa multipocillo del ensayo con *A. franciscana*.

En la tabla 2, se exponen los volúmenes exactos de tóxico y medio para artemias utilizados para cada concentración en la placa multipocillo.

Tabla 2. Volúmenes de cada componente para la obtención de las concentraciones para el ensayo con el tóxico de referencia

Columna Placa Multipocillo	Concentración $K_2Cr_2O_7$ (mg/L)	V. de $K_2Cr_2O_7$ (mL)	V. Medio Artemias (mL)	V. Final (mL)
T.1	100,00	2	0	2
T.2	90,00	1,8	0,2	2
T.3	80,00	1,6	0,4	2
T.4	65,00	1,3	0,7	2
T.5	50,00	1	1	2
T.6	-	0	2	2

Una vez finalizada las diluciones, se agrega un número suficiente de larvas *A. franciscana* en la última fila de la placa utilizando una pipeta automática de 200 µl. De este modo, las larvas quedan impregnadas de la concentración pertinente a cada columna, y posteriormente, de este pocillo se trasvasan aproximadamente 10 larvas del crustáceo a los pocillos superiores (figura 21).

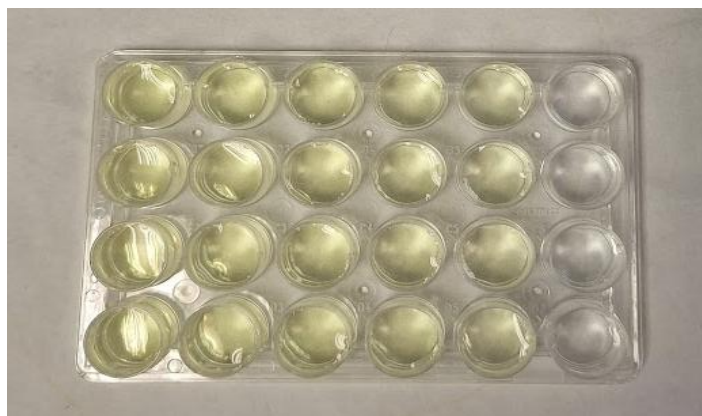


Figura 21. Placa multipocillo con las soluciones del bioensayo.

Finalmente, la placa se sella con cinta PARAFILM® para su incubación en una cámara de laboratorio a temperatura constante de 25°C durante 24 horas, obteniendo larvas desarrolladas en segundo y tercer estadio para el test de toxicidad. Tras este periodo, se procede a la lectura de los resultados biológicos obtenidos.

3.5.3 ENSAYO DE TOXICIDAD DE LAS MUESTRAS DE SEDIMENTO

Paralelamente al ensayo con el compuesto estándar, se lleva a cabo el ensayo de toxicidad aguda con el elutriado de las seis muestras de estudio. Para garantizar la fiabilidad y reproducibilidad del procedimiento experimental, se realizan 3 réplicas independientes por cada muestra mediante placas multipocillo (figura 22).



Figura 22. Material experimental para el bioensayo con *A. franciscana*.

En este caso, se adicionan directamente 2 mL de cada muestra en las distintas columnas de la placa, siguiendo un orden sucesivo de muestra uno a muestra seis. Así pues, mediante pipeta de 10 mL, se trasfiere el volumen correspondiente del recipiente del elutriado de cada muestra a la columna de pocillos asignados.

En la tabla 3, se recogen los volúmenes para cada muestra de sedimento, y el número de réplicas.

Tabla 3. Volúmenes del elutriado de las muestras en las placas multipocillo

Columna Placa Multipocillo	V. Adicionado (mL)	V. Final (mL)	Réplicas
M.1	2	2	3
M.2	2	2	3
M.3	2	2	3
M.4	2	2	3
M.5	2	2	3
M.6	2	2	3

A continuación, se sigue el mismo protocolo descrito en el apartado 3.4.3, añadiendo larvas de *Artemia franciscana* a los pocillos pertinentes y sellando con cinta PARAFILM® para su incubación, con las mismas condiciones térmicas de 25°C en un periodo de 24 horas. Transcurrido este tiempo, se registran los datos resultantes y se comparan las respuestas obtenidas de cada muestra respecto al control y entre estas.

3.6 BIOENSAYO CON *PARACENTROTUS LIVIDUS*

Para evaluar la posible toxicidad de las muestras de sedimento generados en la DANA, se realiza un bioensayo utilizando las larvas de *Paracentrotus lividus* de forma paralela al ensayo de *A. franciscana*. El uso de embriones *P. lividus* como organismo modelo es debido a su alta sensibilidad a contaminantes en su medio natural, mostrando alteraciones en las etapas iniciales de desarrollo ante su presencia.

A diferencia del bioensayo con *Artemia franciscana*, no se lleva a cabo un ensayo paralelo con tóxico de referencia, por lo que se centra en el potencial tóxico de los sedimentos tras el evento meteorológico extremo.

3.6.1. PROCESO DE MUESTREO DE ERIZOS

El proceso de captura de los erizos de mar se lleva a cabo en una única salida al municipio de Jávea (Alicante), concretamente en una zona conocida como “Cala Blanca” (38° 45’42” N, 0°12’24” E). Esta área costera presenta sustrato rocoso con fondo de grava, además de gran presencia de algas en zonas someras y sumergidas, lo que proporciona un hábitat propicio tanto para el asentamiento como para el desarrollo de poblaciones de *Paracentrotus lividus*.

Durante la recolección, se seleccionaron individuos adultos con diámetro corporal superior a los 40 mm, con la finalidad de garantizar su capacidad reproductiva para el bioensayo en laboratorio. En total, se recolectaron entre 10 y 15 ejemplares para disponer de suficientes individuos viables de ambos sexos.

El equipo utilizado en la extracción ha sido trajes de neopreno, escaupines, guantes, así como gafas, aletas y tubo de buceo. Para desprender a los erizos de las rocas se ha utilizado una espátula, aplicando fuerza cuidadosamente para no dañar a los individuos.

Además de los ejemplares, también se recogieron rocas con microalgas adheridas y agua de mar del mismo lugar de muestreo, para mantener a los individuos en

condiciones adecuadas durante su traslado y posterior mantenimiento en las peceras del laboratorio. El agua de mar fue filtrada mediante el proceso mencionado en el apartado 3.4.3.

Los erizos se depositan en una malla de recolección y son posteriormente trasladados en un recipiente con agua de su hábitat para mantener sus condiciones naturales en el transporte. En el laboratorio, los erizos se dispusieron en peceras acondicionadas con el agua y las rocas previamente recogidas. Para asegurar un entorno adecuado y evitar la expulsión de los gametos por estrés, se implementaron un sistema de filtración, un difusor de oxígeno, y las algas recogidas sirvieron como fuente de alimento (figura 23).



Figura 23. Pecera acondicionada con los ejemplares de *P. lividus* para el bioensayo

3.6.2 EXTRACCIÓN DE GAMETOS

En primer lugar, se escogen diversos ejemplares adultos de *Paracentrotus lividus*, de forma que se garantice la presencia de al menos un macho y una hembra que permitan llevar a cabo de la fecundación in vitro.

La obtención de los gametos de erizo de mar se realiza administrando una solución de cloruro de potasio (KCl) a una concentración 0,5 M. Se inyecta 1mL de KCl utilizando una jeringuilla limpia en la zona peristomal, correspondiente al tejido blando que rodea la boca del erizo. Se realizan movimientos circulares suaves para favorecer la distribución del KCl dentro del organismo y estimular la liberación de gametos.

Unos minutos después de la inyección, se liberan el material reproductivo. En este proceso se hace la distinción entre sexos, los machos expulsan un fluido blanco, el esperma, mientras que las hembras liberan un fluido anaranjado, correspondiente a los oocitos (figura 24).

Previamente a la fecundación in vitro, se evalúa la calidad de los gametos obtenidos. El material es recogido con una pipeta Pasteur y se deposita en una placa de Petri para su observación en el microscopio. En el caso de los espermatozoides, se valora que muestren una elevada movilidad y, en el caso de los oocitos, que tengan forma esférica, doble membrana visible y con un diámetro aproximado de 100 μm .



Figura 24. Material reproductivo de los ejemplares de erizo, a la izquierda la hembra y en la derecha el macho

3.6.3 PROCESO DE FECUNDACIÓN IN VITRO

Tras validar la calidad de los gametos, se realiza la fecundación in vitro en condiciones controladas en laboratorio. Para ello, se trasvasan 100 mL de agua de mar limpia y filtrada, con el método descrito en el apartado 3.5.3, a una probeta. A continuación, se recogen los oocitos con una pipeta Pasteur y se añaden al recipiente entre 4 y 5 gotas, hasta que presente una concentración homogénea. La probeta no debe tener una excesiva coloración, para evitar una densidad muy alta de oocitos (figura 25).

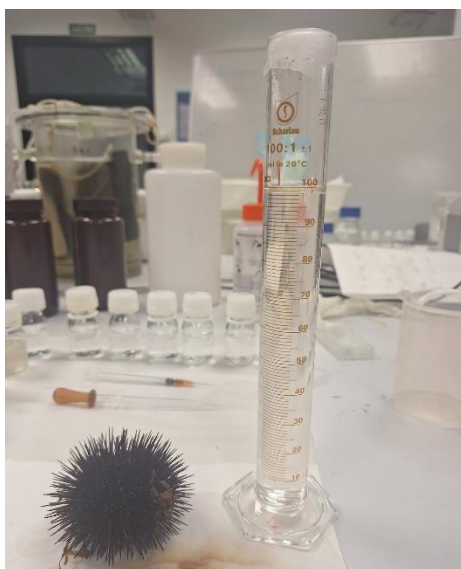


Figura 25. Probeta de 100 mL con el agua de mar filtrada y los oocitos obtenidos

Transcurridos 5 minutos, se recoge el esperma con otra pipeta estéril, se añade una gota y se sella la probeta con cinta PARAFILM. Finalmente, el recipiente se voltea de forma suave y constante en sentido vertical durante un par de minutos, con el objetivo de favorecer el contacto entre los gametos y facilitar la fecundación

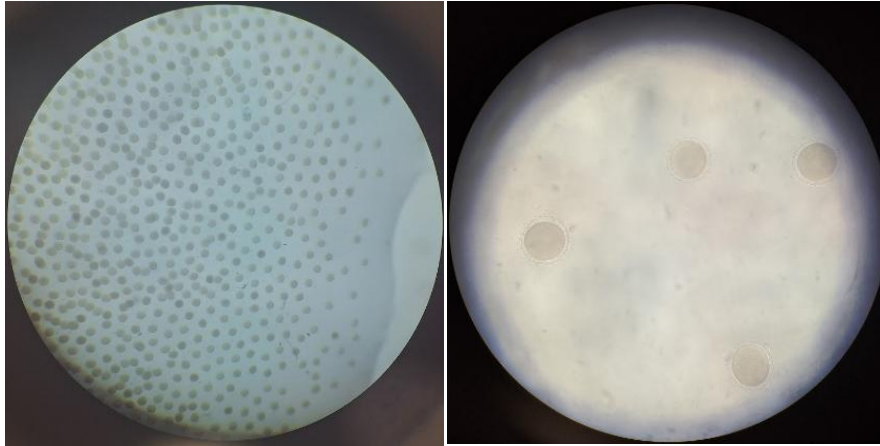


Figura 26. Oocitos sin fecundar a la izquierda captados con un objetivo de 10x, y oocitos con doble membrana y forma esférica a la derecha, captados con un objetivo de 40x al microscopio óptico.

Una vez transcurridos entre 5 y 10 minutos tras una agitación suave del recipiente, se realiza el cálculo del éxito de fecundación y la densidad de los oocitos. En la figura 26, se observan con diferentes objetivos microscópicos el resultado de los oocitos al inicio y al final del procedimiento de fecundación.

• EVALUACIÓN DEL ÉXITO DE FECUNDACIÓN

Para analizar el grado de fecundación obtenido, se emplea una cámara cuentaglóbulos y un microscopio. El objetivo es realizar un conteo de las células fecundadas, aquellas que presentan la membrana de fertilización, y las no fecundadas, para hallar el porcentaje de éxito.

Para ello, se toman 4 réplicas de 20 μL y se disponen en la cámara cuenta glóbulos, por 9 celdas de 1mm^2 y una altura de 0,1 mm. A continuación, se procede a contar el número de los oocitos fecundados respecto de la totalidad de oocitos para cada una de las 4 réplicas. Una vez obtenidos los respectivos valores, se calcula el promedio del éxito de fecundación, teniendo en cuenta que el resultado debe ser igual o superior al 90% para considerar válido el material para la fecundación y su uso en el bioensayo.

• ESTIMACIÓN DE DENSIDAD DE OOCITOS

En el cálculo de la densidad de oocitos, se consideran las mismas réplicas que en el paso anterior, y se desestiman aquellas con valores extremos. Con las dos réplicas restantes, se realiza el promedio y con ello, el cálculo de volumen de material en la probeta que contenga 500 oocitos. Este volumen representa la cantidad a transferir a cada recipiente del bioensayo, enrasando con agua de mar filtrada hasta alcanzar un volumen final de 20 mL. Este procedimiento permite obtener una densidad final de 25 oocitos/mL, asegurando una concentración controlada y homogénea de larvas para cada réplica del bioensayo.

$$N_{\text{oocitos totales}} = \sum \text{oocitos fecundados en 9 celdas}$$

$$N_{\text{oocitos/mL}} = \frac{N_{\text{oocitos totales}}}{N_{\text{celdas}}} \cdot \frac{1000 \text{ mm}^3}{0,1 \text{ mm}^3}$$

$$V (\mu\text{L}) = \frac{20 \text{ mL} \cdot (25 \frac{\text{oocitos}}{\text{mL}})}{N_{\text{oocitos/mL}}}$$

3.6.4 INCUBACIÓN Y DESARROLLO LARVARIO

Tras comprobar los criterios de calidad del material biológico, se transfiere en botes de cristal, el volumen estimado previamente a partir del conteo de oocitos fecundados. Estos recipientes se mantuvieron en condiciones controladas durante un periodo de 48 horas en completa oscuridad a una temperatura de 20°C.

Finalizado el periodo de incubación, se adicionan dos gotas de formol al 40% a cada uno de los frascos del bioensayo para interrumpir el desarrollo de las larvas y conservar el material biológico para los siguientes análisis.

3.6.5 PRUEBA DE TOXICIDAD CON MUESTRAS DE SEDIMENTOS

El bioensayo de toxicidad se lleva a cabo con la preparación previa del elutriado de las muestras de sedimentos tras la DANA, según la metodología detallada en el apartado 3.5.3.

Los huevos fecundados de *Paracentrotus lividus* se trasvasan a recipientes de vidrio de capacidad 25 mL con el volumen correspondiente a los oocitos fecundados para una densidad final de 25 oocitos/mL, tal como se describe en el apartado 3.6.3. En total, se realizan 10 réplicas para el blanco y 6 por cada muestra (figura 27).

Los recipientes de vidrio se incuban durante un periodo de 48 horas en completa oscuridad a 20°C. Tras el periodo de exposición al sedimento, se añaden dos gotas de formol al 40% para detener el desarrollo embrionario.

Finalmente, se procede a evaluar el desarrollo larvario obtenido para el control y las muestras mediante observación microscópica.

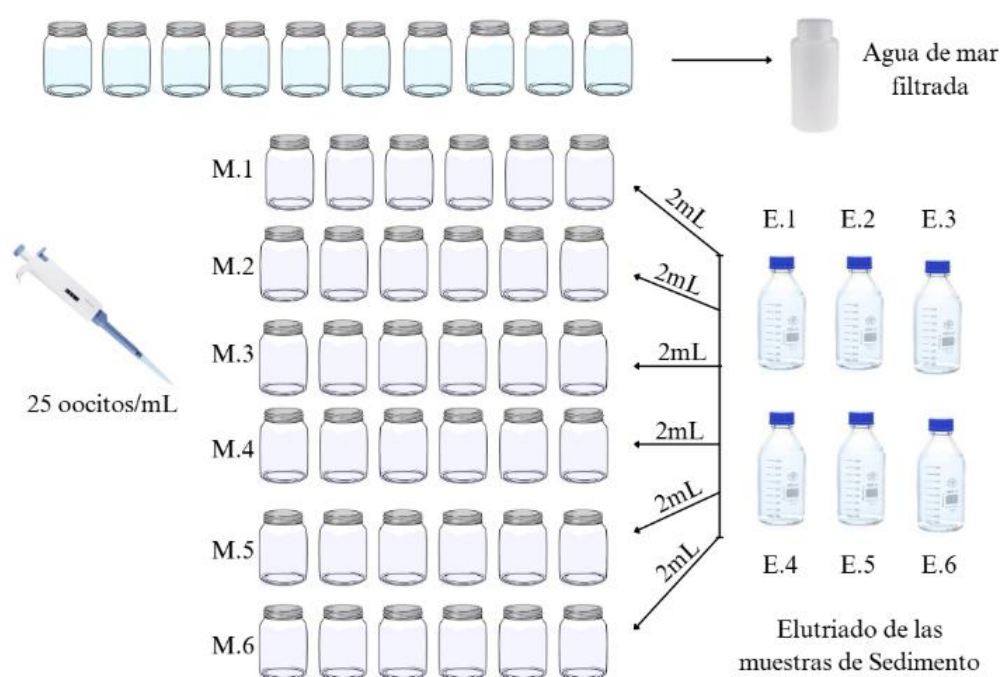


Figura 27. Esquema representativo de la preparación de muestras (M.1-M.6) en el bioensayo de *Paracentrotus lividus*

3.6.6 DETERMINACIÓN Y ANÁLISIS DE VARIABLES EXPERIMENTALES

Una vez finalizado el periodo de incubación de 48 horas, se procede a evaluar el impacto del elutriado del sedimento sobre el desarrollo embrionario de *Paracentrotus lividus*. Para ello, se analizan tres variables de respuesta: éxito de embriogénesis, crecimiento larvario y grado de desarrollo. Las mediciones y observaciones se llevan a cabo mediante microscopía invertida, lo que permite registrar los datos necesarios para el estudio.

A) EVALUACIÓN DE EMBRIOGÉNESIS

En la observación del desarrollo embrionario, se clasifican las larvas de *P. lividus* en función de su grado de desarrollo, diferenciando aquellas que presentan una morfología normal de aquellas que muestran crecimiento incompleto o anormal.

Para cada réplica de elutriado y del control, se seleccionan de forma aleatoria 100 larvas plúteus, se examinan en el microscopio invertido y se identifican las que presentan un desarrollo embrionario adecuado, caracterizado por la presencia de cuatro brazos bien definidos con una longitud aproximada de 400 µm.

A partir de este conteo, se calcula el porcentaje de éxito de embriogénesis de cada muestra en relación con el control, expresado como la proporción de larvas con morfología normal respecto al total observado. A continuación, se presenta la ecuación empleada para realizar este cálculo:

$$\text{Embriogénesis (\%)} = \frac{N_{\text{larvas con desarrollo normal}}}{N_{\text{total de larvas}}} \times 100$$

B) MEDICIÓN DEL CRECIMIENTO DE LAS LARVAS

El crecimiento larvario se evalúa a partir de la longitud de las larvas plúteus con desarrollo normal, midiendo desde el extremo superior hasta el final del brazo postoral, tomando como referencia el perfil lateral del organismo (figura 28).

Dado que la orientación de las larvas observadas puede variar y afectar en la precisión de las medidas, se adopta como criterio medir siempre el lateral de las larvas plúteus, tal como se establece en el protocolo descrito por Garmendia et al. (2009).

Para ello, se seleccionan aleatoriamente 25 individuos por cada réplica del ensayo, y se mide su longitud mediante una regla incorporada en la lente del microscopio invertido.



Figura 28. Longitud de larvas *Paracentrotus lividus*, desarrollo incompleto a la izquierda, y un desarrollo adecuado a la derecha.

A partir del registro de valores, se calcula el promedio de longitud larvaria para cada muestra, permitiendo la comparación del crecimiento larvario entre el control y las muestras de sedimento.

Para este estudio no se han utilizado una serie de diluciones de las muestras, sino que se ha ensayado con el 100% de la concentración en cada una.

C) ANÁLISIS DEL GRADO DE DESARROLLO EMBRIONARIO

En este análisis se evalúa el desarrollo embrionario de *P. lividus*. La interrupción del desarrollo en las primeras etapas, como primera división celular, blástula o gástrula, indica un alto nivel de toxicidad en las muestras. En cambio, si el desarrollo se detiene en la fase de pre-plúteus, se clasifica como toxicidad leve a moderada. Por último, si las larvas alcanzan etapa de plúteus, se interpreta que la muestra carece de efectos tóxicos significativos (figura 29).



Figura 29. Estados larvarios de *Paracentrotus lividus* ilustrados en orden cronológico de evolución.
Fuente: Garmendia et al., 2009

3.7 CRITERIOS DE VALIDACIÓN DEL ENSAYO (BLANCO-CONTROL)

Para asegurar la fiabilidad de los bioensayos de toxicidad realizados se utilizó agua de mar tanto en los ensayos como en la preparación del elutriado de las muestras. Para garantizar la validez de los resultados, se incluyeron controles en blanco para comprobar la calidad del agua y de los organismos empleados. Los ensayos se consideraron válidos cuando el éxito de la embriogénesis en los controles fue igual o superior al 90%, condición que se cumplió en todos los casos.

3.8 CRITERIOS DE TOXICIDAD EN LAS MUESTRAS

Una vez validado el material biológico mediante el éxito de fecundación, se procedió a evaluar la toxicidad en las muestras de sedimento.

De acuerdo con el protocolo descrito por Garmendia et al. (2009), para clasificar una muestra como tóxica en el desarrollo embrionario de *Paracentrotus lividus* deben darse ambas condiciones:

- a) Una reducción superior al 20% en el porcentaje de éxito embriogénico respecto al control.
- b) Una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) entre las muestras y el control, siempre que se cumplan las condiciones de normalidad y homocedasticidad.

A continuación, se describe el procedimiento para la comprobación de las condiciones de toxicidad.

3.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Para la evaluación de la toxicidad en los bioensayos con *Artemia franciscana* y *Paracentrotus lividus*, se aplicaron criterios de validez y métodos estadísticos para interpretar los resultados obtenidos de las muestras. Todos los análisis fueron realizados mediante los programas Statgraphics y Microsoft Excel.

En el bioensayo con *A. franciscana*, se determinó la dosis letal media (LD50) a partir de los datos de mortalidad resultantes con el tóxico dicromato potásico. Esta concentración se calculó mediante la ecuación de la recta obtenida de la representación gráfica del porcentaje de mortalidad en función de la concentración del tóxico. Por otro lado, se determinan las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas entre los distintos elutriados del sedimento. Dado que no se cumplen los supuestos de normalidad y homogeneidad, se procede a utilizar un test no paramétrico, que en este caso fue el de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$).

En cuanto al ensayo con *P. lividus*, se comprobó la validez del procedimiento de forma que el éxito embriogénico en el blanco fuera igual o superior al 90% (Garmendia et al, 2009). En la evaluación de la toxicidad de las muestras, se calculó el porcentaje promedio del éxito del desarrollo embrionario tanto en el control como en cada una de las muestras de estudio, adoptando como umbral crítico una disminución superior al 20% respecto al control.

Respecto a la significancia estadística entre el control y las muestras en la variable de éxito de desarrollo (%), se comprobaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas de las réplicas del elutriado, mediante el coeficiente de asimetría y curtosis, y el test de Levene, respectivamente. En caso de que se den ambas condiciones, se realiza un análisis de varianza paramétrico, ANOVA de un solo factor, o no paramétrico, test de Kruskal-Wallis, según corresponda.

Asimismo, para analizar la variable de longitud larvaria en *P. lividus* se realiza el mismo procedimiento: un análisis de varianza, ANOVA de un solo factor, para comparar esta variable entre las muestras y el control, posteriormente a la comprobación del cumplimiento de las condiciones de normalidad y homogeneidad de varianzas.

4. RESULTADOS

En el siguiente apartado se presentan los resultados obtenidos a lo largo del estudio de toxicidad. En primer lugar, se expone la caracterización fisicoquímica de las muestras de sedimento generadas en la DANA, con el fin de conocer sus propiedades y posibles relaciones con los efectos observados en los ensayos. Seguidamente, se recogen los resultados del bioensayo realizado con *Artemia franciscana*, con la evaluación de la mortalidad en las distintas muestras de sedimento y el tóxico de referencia. Finalmente, se exponen los datos obtenidos del bioensayo con *Paracentrotus lividus*, con el análisis de las variables experimentales. Los análisis estadísticos aplicados en cada caso se describen de forma más completa en los anexos

4.1 CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA

En la tabla 4, se presentan los valores obtenidos para diferentes parámetros fisicoquímicos en las seis muestras de estudio, M.1 a M.6. La caracterización realizada determina el contenido en humedad, materia orgánica, pH y conductividad eléctrica. En el anexo II, se incluyen los resultados detalladamente de cada parámetro.

Tabla 4. Resultados de los parámetros fisicoquímicos analizados en muestras de sedimento, M.1 a M.6

Parámetro	M.1	M.2	M.3	M.4	M.5	M.6
Humedad (%)	13,17%	20,97%	59,37%	42,82%	33,57%	33,31%
Materia Orgánica (%)	4,20%	4,45%	5,26%	10,73%	6,38%	1,01%
pH	7,70	7,45	7,30	7,83	7,78	7,86
Conductividad ($\mu\text{S/m}$)	235,00	180,20	351,00	188,00	199,00	136,60

La muestra 3 asociada al aparcamiento subterráneo, presenta el valor más elevado tanto en contenido de humedad, con un 59,37%, y de conductividad, 351 $\mu\text{S/m}$. Esto indica una elevada acumulación de agua y sales disueltas en un espacio cerrado inundado durante el fenómeno meteorológico. Al contrario, la muestra 1 correspondiente a la entrada al término municipal, presenta el menor dato de humedad.

El contenido de materia orgánica es mayor en la muestra 4, recogida en patio residencial con vegetación, probablemente debido a la influencia del abono orgánico y materia vegetal en la zona. En contraposición, la muestra 6 procedente del área industrial, presenta el resultado más bajo debido a la predominancia de materiales inorgánicos.

En cuanto al pH, se mantiene neutro en todas las muestras, en un rango entre 7,30 y 7,86. Así pues, las diferencias en pH y conductividad eléctrica muestran heterogeneidad en la composición de los sedimentos arrastrados, afectados por fuentes contaminantes distintas en función de las áreas urbanas e industriales.

Así pues, las muestras 1 y 2, corresponden a puntos de muestreo en la entrada al municipio de Massanassa, con características relativamente similares. Ambas presentan un bajo porcentaje de humedad (%), valores de materia orgánica (%) comparables y los parámetros de pH y conductividad, sin diferencias relevantes. Por otro lado, las muestras 3,4 y 5, pertenecen a zonas urbanas, tanto en espacios cerrados, como en patios y aparcamientos. Estas presentan porcentajes de humedad más elevados y mayor contenido en materia orgánica, especialmente la muestra 4 con el valor máximo. Finalmente, la muestra 6 recogida en la zona industrial del término municipal, presenta el porcentaje más bajo de materia orgánica, y la menor conductividad de todas las muestras. Esta distribución exterioriza la influencia de la DANA en la dispersión de los contaminantes potenciales.

4.2 BIOENSAYO CON *ARTEMIA FRANCISCANA*

En el anexo III, se incluyen los datos específicos, desglosados para cada réplica de las muestras y para el tóxico de referencia empleado.

4.2.1 ESTUDIO TOXICOLÓGICO CON TÓXICO DE REFERENCIA

En la figura 30, se representa la relación entre la mortalidad de los individuos de *Artemia franciscana* y el logaritmo de la concentración del tóxico de referencia ($K_2Cr_2O_7$), tras el periodo de exposición de 24 horas.

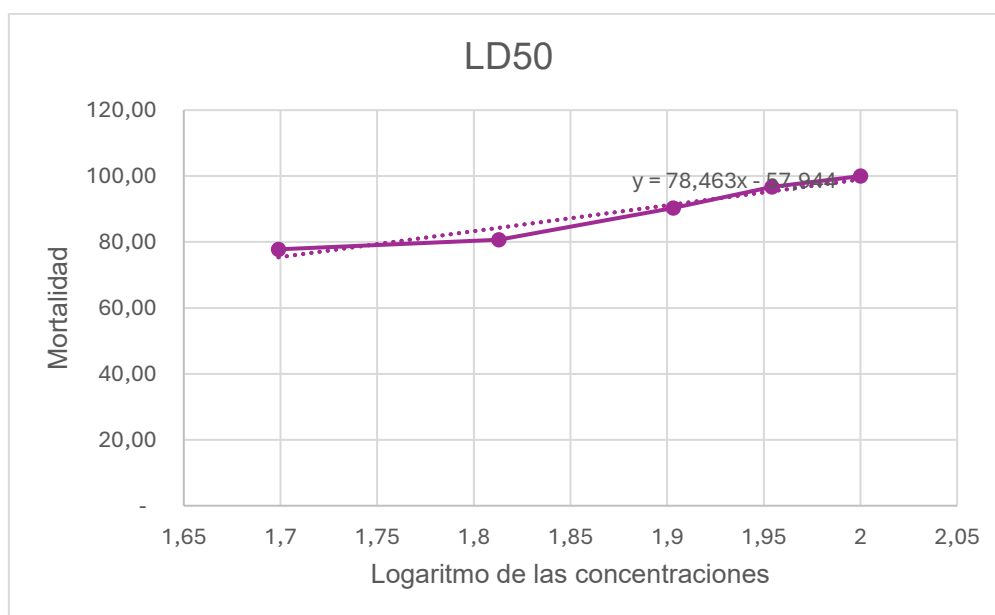


Figura 30. Relación entre la concentración del tóxico de referencia ($K_2Cr_2O_7$) y la mortalidad en *Artemia franciscana*. Estimación de la DL50 a partir de la ecuación de la curva.

En la curva dosis-respuesta se observa el incremento progresivo en la mortalidad del organismo modelo a medida que la concentración del tóxico aumenta. La ecuación obtenida mediante regresión lineal permitió el cálculo de la dosis letal 50 (DL50), cuyo valor fue de 23,754 mg/l. Este resultado confirma la sensibilidad de *A. franciscana* a la exposición aguda al dicromato potásico y valida el uso del bioensayo en la evaluación de toxicidad.

4.2.2 ESTUDIO TOXICOLÓGICO CON MUESTRAS

En la tabla 5, se expone la mortalidad observada en el elutriado correspondientes a las seis muestras analizadas, a una concentración del 100%. Se realizaron 3 réplicas por cada una de las muestras, y se calculó el promedio de mortalidad correspondiente en cada caso.

Tabla 5. Mortalidad resultante tras el periodo de exposición de las muestras a *Artemia franciscana*.

Muestras	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio
M.1	0,00%	3,13%	3,33%	2,15%
M.2	6,45%	0%	6,67%	4,37%
M.3	3,45%	7%	6,90%	5,75%
M.4	6,45%	3%	0,00%	3,19%
M.5	6,45%	3%	3,23%	4,38%
M.6	3,33%	0%	9,68%	4,34%
Blanco	3,23%			

Los resultados del análisis muestran valores de mortalidad bajos, que oscilan entre 2,15% y 5,75%. El valor de mortalidad en el control-blanco fue de 3,23%, siendo destacable ya que sirve de referencia para interpretar la respuesta biológica. Dado que ninguna de las seis muestras se sitúa en un nivel similar o levemente superior al blanco, se puede concluir que ninguna de las muestras indujo a *Artemia franciscana* una toxicidad aguda significativa.

Por otro lado, en la evaluación de resultados de forma estadística, se muestran los valores del análisis de Kruskal- Wallis (tabla 6).

Tabla 6. Datos resultantes del test de mortalidad de Kruskal-Wallis a los grupos del blanco y las muestras para *Artemia franciscana*.

Muestra	Réplicas	Rango Promedio
M1	3	6,333
M2	3	10,167
M3	3	14,667
M4	3	7,000
M5	3	8,833
M6	3	10,000
P-VALOR	0,451	

En el análisis de Kruskal-Wallis, se toma como supuesto que no existen diferencias a nivel estadístico significativas entre ellas cuando el p-valor es superior al 0,05. Por tanto, no se detectan estas diferencias significativas entre los grupos evaluados.

En conjunto, los datos respaldan que las muestras de sedimento del estudio no generan efectos tóxicos relevantes en *Artemia franciscana* en términos de toxicidad aguda. Únicamente la muestra 3, es la que presenta mayor mortalidad.

4.3 BIOENSAYO CON *P. LIVIDUS*

Los resultados detallados y demás observaciones complementarias se recogen en el Anexo IV.

4.3.1 DESARROLLO EMBRIONARIO

En la tabla 7, se muestran los porcentajes del éxito en el desarrollo en *P. lividus* en las diferentes réplicas experimentales.

Tabla 7. Tasa de éxito de desarrollo por réplica

Réplicas	Éxito de Desarrollo (%)
Blanco	97,3
M.1	96,9
M.2	98,3
M.3	97,8
M.4	96,0
M.5	95,8
M.6	99,0

Los resultados reflejan un alto nivel de éxito de forma general, con valores comprendidos entre el 95,8% y el 99,0%. En cuanto al blanco, presentó un éxito del 97,3%, lo que indica que el procedimiento experimental tuvo un desarrollo efectivo. Asimismo, se observa que ninguno de las muestras presentó una disminución igual o superior al 20% respecto al control, por lo que no se cumple el primer criterio para considerar toxicidad de las muestras.

4.3.2 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA TOXICIDAD DE LAS MUESTRAS

Para estudiar la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre las muestras de estudio y el control, se llevó a cabo un análisis estadístico comparativo siguiendo el protocolo de Garmendia et al. (2009).

Previamente, se evaluaron dos supuestos para justificar la aplicación de pruebas paramétricas. Se analizó la normalidad y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Curtosis (tabla 8), y el test de Levene (tabla 9), respectivamente.

*Tabla 8. Datos obtenidos en el test de Curtosis y la asimetría en los grupos del blanco y las muestras para *P. lividus*.*

Muestras	Kurtosis (Blanco)	Kurtosis (Muestras)	Skewness (Blanco)	Skewness (muestras)
Blanco y M1	-0,396	-0,604	-0,508	-0,904
Blanco y M2	-0,396	1,324	-0,508	-1,610
Blanco y M3	-0,396	0,834	-0,508	-1,296
Blanco y M4	-0,396	1,808	-0,508	1,756
Blanco y M5	-0,396	-1,036	-0,508	-0,162
Blanco y M6	-0,396	-0,391	-0,508	-0,889

De acuerdo con los valores de curtosis y asimetría, todas las muestras se enmarcan en el rango de -2 y +2, lo que sugiere que no presentan una desviación relevante respecto a la distribución normal.

Tabla 9. Resultados del test de Levene para homogeneidad de varianza en los grupos de blanco y las muestras para P. lividus.

Muestras	Levene's (p-valor)
Blanco y M1	0,150
Blanco y M2	0,320
Blanco y M3	0,364
Blanco y M4	0,681
Blanco y M5	0,011
Blanco y M6	0,737

En el test de Levene de la tabla 9, se utiliza como criterio p-valor superior al 0,05 para aceptar la homogeneidad de varianzas. En el caso del blanco y la muestra 5, esta condición no se da, por lo que la hipótesis de homogeneidad de varianzas no se cumple se rechaza en esa comparación.

Así pues, se realiza un análisis ANOVA para todas las muestras a excepción de la 5 (tabla 10). Al no cumplirse ambos supuestos de normalidad y homogeneidad en esta muestra, se realiza el test no paramétrico de Krutal-Wallis (tabla 11).

Tabla 10. Valores del análisis ANOVA para el grupo del blanco y las muestras (1,2,3,4,6) para

Muestras	P-valor
Blanco y M1	0,6509
Blanco y M2	0,2739
Blanco y M3	0,5339
Blanco y M4	0,1617
Blanco y M6	0,0244

Los grupos M1, M2, M3 y M4, los p-valores son mayores a 0,05, por lo que no hay diferencias estadísticamente significativas respecto al Blanco. Sin embargo, M6, sí que muestra esta diferencia al presentar un valor inferior al 0,05.

Respecto a la muestra 6 que presentó un p-valor < 0,05, se cumple el segundo criterio de relevancia estadística entre la muestra y el control. Sin embargo, al no cumplirse la primera condición de éxito embriogénico, ya que el porcentaje de desarrollo embrionario fue de 99%, superior al del control, no se considera tóxica según el protocolo. Si bien existen diferencias estadísticamente significativas, el porcentaje de éxito de desarrollo embrionario en el elutriado de M6 fue superior al del blanco, por lo que no existe evidencia de toxicidad bajo ningún aspecto.

Tabla 11. Valores del test de Kruskal-Wallis para el grupo del blanco y las muestras para Artemia Franciscana

Muestras	Kruskal-Wallis
Blanco y M5	0,477

Para este caso, el p-valor es superior al 0,05, por lo tanto no hay diferencia estadísticamente significativa entre el grupo del Blanco y M5.

Finalmente, tras realizar el análisis estadístico de los resultados finales, se establece:

- a) Ninguna muestra presenta una reducción mayor del 20% respecto del control.
- b) Ninguna muestra tiene p-valor < 0,05 respecto del control, que estuviera asociado a un porcentaje de éxito embriogénico inferior a este.

Por lo tanto, ninguna muestra se considera tóxica según los criterios del protocolo (Garmendia et al.,2009).

4.3.3 LONGITUD DE LAS LARVAS

En la tabla 12, se presentan los resultados de longitud media (μm) de las diferentes muestras de sedimento tras el periodo de exposición de 48 horas.

Tabla 12. Longitud media de las larvas por cada muestra, M.1 a M.6

Réplicas	Promedio de longitud larvaria (μm)
Blanco	408,0
M.1	290,0
M.2	267,6
M.3	277,0
M.4	334,0
M.5	284,0
M.6	324,0

En la figura 31, se presenta gráficamente la dispersión de los valores de longitud larvaria para las muestras de sedimento M.1 a M.6.

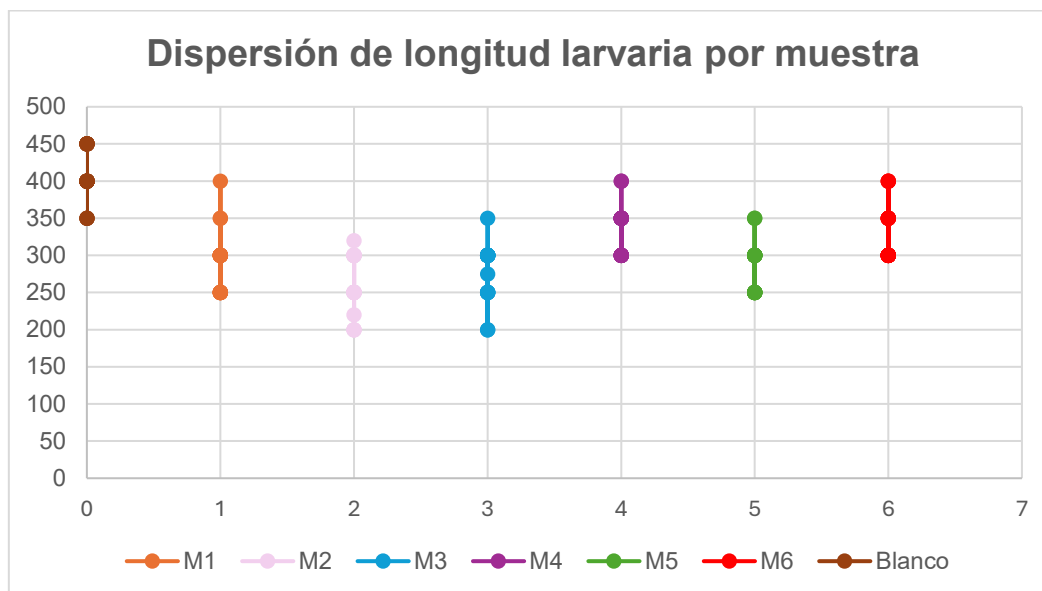


Figura 31. Representación del rango de valores de longitud larvaria en cada muestra y control.

En la figura 31, se observa que las muestras presentan variaciones en la longitud larvaria, con valores medios ligeramente inferiores a los del control, oscilando 270-330 μm frente a los 408 μm del blanco. Sin embargo, estas reducciones no implican una toxicidad severa, ya que no se cumplen los criterios establecidos por Garmendia et al. (2009) para el desarrollo embrionario. Esta disminución podría relacionarse con una sensibilidad embrionaria a ciertos compuestos del elutriado.

Para determinar si existían diferencias significativas entre las longitudes larvarias de las muestras y en el control, se realizó un análisis de varianza, ANOVA de un factor. Previamente, se analizan los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas como en el caso de *A. franciscana*.

Tabla 13. Resultados del coeficiente estadístico de Curtosis y asimetría para el grupo del blanco y las muestras para *Paracentrotus lividus*.

Muestras	Kurtosis (Blanco)	Kurtosis (Muestras)	Skewness (Blanco)	Skewness (muestras)
Blanco y M1	-0,279	1,536	-0,226	1,995
Blanco y M2	-0,279	-0,970	-0,226	-0,861
Blanco y M3	-0,279	0,834	-0,226	-1,610
Blanco y M4	-0,279	-0,549	-0,226	0,815
Blanco y M5	-0,279	0,539	-0,226	0,815
Blanco y M6	-0,279	0,148	-0,226	1,825

Como se presenta en la tabla 13, los coeficientes de curtosis y asimetría de todos los grupos se encuentran dentro del rango -2 y +2. Por tanto, se puede establecer que las distribuciones de los datos para cada muestra validan el supuesto de normalidad.

Tabla 14. Valores del test de Levene para el grupo del blanco y las muestras para *Paracentrotus lividus*.

Muestras	Levene's (p-valor)
Blanco y M1	0,338
Blanco y M2	0,092
Blanco y M3	0,393
Blanco y M4	0,344
Blanco y M5	0,460
Blanco y M6	0,177

De acuerdo con los datos del test de Levene en la tabla 14, se cumple el supuesto de homogeneidad de varianza en todas las muestras, ya que el p-valor es menor o igual al 0,05. Así pues, se justifica el uso del análisis ANOVA para este caso de estudio.

Tabla 15. Comparación múltiple de las muestras respecto del control por el análisis ANOVA.

Muestras	ANOVA (p-valor)
Blanco y M1	0,0000
Blanco y M2	0,0000
Blanco y M3	0,0000
Blanco y M4	0,0000
Blanco y M5	0,0000
Blanco y M6	0,0000

En la tabla 15, se presentan los p-valores de cada grupo, siendo en todos los casos igual a cero. Por tanto, indica que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las muestras de sedimento y el grupo control.

4.3.4 FASE DE DESARROLLO LARVARIO

En cuanto al estado de desarrollo alcanzado en cada muestra, los resultados se resumen en la tabla 16.

Réplicas	Grado de Desarrollo	Otros estados observados
Blanco	Larva Plúteus	-
M.1	Larva Plúteus	Preplúteus y gástrula
M.2	Larva Plúteus	Blástula
M.3	Larva Plúteus	Preplúteus y blástula
M.4	Larva Plúteus	Preplúteus y blástula
M.5	Larva Plúteus	Preplúteus
M.6	Larva Plúteus	Preplúteus

Tabla 16. Estadios larvarios observados en el bioensayo de Paracentrotus lividus.

En todas las muestras de sedimento analizadas, así como en el blanco, la mayoría de los embriones alcanzaron el estado de larva plúteus reflejando el desarrollo óptimo. No obstante, en las muestras, también se observaron ejemplares en estadios anteriores, entre ellos preplúteus, gástrula o blástula

Estas observaciones se respaldan por los resultados de longitud larvaria, que mostraron una reducción estadística significativa ($p < 0,0001$) en todas las muestras respecto al control. Sin embargo, aunque se presente un retraso leve en el desarrollo, es insuficiente para ser considerado tóxico según los umbrales establecidos por Garmendia et al. (2009). En conclusión, las muestras de sedimento no interrumpieron el desarrollo normal de los embriones de *P. lividus* aunque sí parece afectar a la longitud larvaria, indicando un posible efecto negativo de los sedimentos sobre su crecimiento.

5. DISCUSIÓN

Los resultados del bioensayo realizado con el tóxico de referencia en el caso de *Artemia franciscana* validan la correcta aplicación del protocolo en la evaluación de toxicidad. En el ensayo con diferentes concentraciones de dicromato potásico, se observó una respuesta en función de la dosis en el organismo. Se obtuvo una dosis letal (DL50) de 23,754 mg/L, confirmando la sensibilidad de *A. franciscana* a la exposición aguda.

El valor de la dosis letal obtenido en este estudio es comparable con el de otros estudios similares, como el reportado por González Gómez (2018). En su trabajo, calculó esta dosis mediante el método Probit, obteniendo un valor de 24,41 mg/L, con límites de confianza del 95% (10,52-40,5 mg/L). Además, el valor de DL50 del control ($K_2Cr_2O_7$) en dicho trabajo, se encontró dentro del rango para bioensayo de toxicidad aguda en invertebrados acuáticos (0,0067-59,9 mg/L). Por tanto, se establece la validez del procedimiento y la idoneidad biológica de la población de crustáceos utilizada en ambos estudios.

La comparación de la dosis letal (DL50) obtenida con valores de otros ensayos de exposición aguda y utilizando el mismo tóxico de referencia ($K_2Cr_2O_7$), expone que el resultado se encuentra dentro del rango de valores referenciados (tabla 17). De esta forma, el protocolo experimental queda validado.

Tabla 17. Valores de DL50 en otros estudios con tóxico de referencia en bioensayos con *A. franciscana*

Autores	Valor L50 (mg/L)	Exposición	Tóxico de Referencia
Ocaranza-Joya et al. (2019)	21	24 horas	$K_2Cr_2O_7$ (mg/L)
Cortés et al. (2018)	19	24 horas	$K_2Cr_2O_7$ (mg/L)
González Gómez (2018)	24	-	$K_2Cr_2O_7$ (mg/L)
(Ruiz-González et al., 2023)	37	24 horas	$K_2Cr_2O_7$ (mg/L)

Tras evaluar los resultados de *A. franciscana* frente a las muestras de sedimentos, se observa un nivel de mortalidad baja en términos generales, en un intervalo entre el 2,15% y el 5,75%. Estos valores reflejan un nivel de toxicidad bajo en una exposición aguda respecto a las muestras analizadas. Según el estudio de Ocaranza-Joya et al. (2018), *A. franciscana* presenta una sensibilidad variable frente a diferentes contaminantes y etapas de desarrollo, por lo que la fluctuación en la mortalidad observada puede asociarse a composición química de los sedimentos. Estos pueden presentar contaminantes en concentraciones reducidas que puedan influir en la respuesta biológica de los organismos.

A nivel estadístico, la comparativa entre las muestras y el control no mostró diferencias estadísticas importantes, de acuerdo con los resultados del test de Kruskal-Wallis ($p=0,451$). En conjunto, tanto el análisis estadístico como los porcentajes de mortalidad permiten clasificar la muestra como no tóxicas en términos de toxicidad aguda.

Por otro lado, en el bioensayo con *Paracentrotus lividus*, el desarrollo embrionario es alto, con un rango éxito de embriogénesis entre 95,8 y 99% en M.5 y M.6, respectivamente. El blanco presenta un éxito del 97,3%, por lo que se valida el

procedimiento experimental, cumpliendo el umbral mínimo del 90%. En conjunto, los resultados indican que no hay toxicidad aguda en la etapa de desarrollo embrionario al no cumplirse el criterio del 20% de reducción tomando como referencia el control (Garmendia et al., 2009).

A nivel estadístico, se realizó un análisis comparativo entre las muestras y el control de acuerdo con el protocolo de Garmendia et al. (2009). Previamente, se verificaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas mediante el test de Curtosis y el test de Levene, respectivamente. Los resultados mostraron que todas las muestras entraban dentro del rango aceptable, indicando una distribución normal. No obstante, la muestra 5 no cumplió el supuesto de homogeneidad de varianzas en comparación con las muestras restantes, por lo que en su caso se aplicó el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Así pues, el p-valor de M5 fue de 0,477 reflejando la ausencia de diferencias a nivel estadístico respecto del control.

Para las muestras que cumplían ambas condiciones, se aplicó un análisis de varianza ANOVA. Los resultados mostraron que todas las muestras excepto la M6 ($p=0,0244$), no presentaron diferencias a nivel estadístico significantes. Este valor pierde relevancia al constatar que su éxito embriogénico es superior al 20% respecto del control, por lo que se clasifica como no tóxica. Por tanto, ambos análisis, estadístico y en porcentaje, garantizan la clasificación de las muestras como no tóxicas en términos de éxito de embriogénesis, de acuerdo con los estudios de Garmendia et al. (2009) y Soualili et al. (2008).

En el caso de longitud larvaria, el total de las muestras de sedimentos presentaron longitudes medias notablemente menores en comparación con el control (408 μm) con el valor más alto de 334 μm de M.6 y el menor 264 μm , de M.2.

La evaluación estadística de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas, se cumplieron en ambos casos, lo que permitió aplicar el análisis de varianza ANOVA. Los resultados del ANOVA mostraron diferencias significativas estadísticamente entre las réplicas y el control, con p-valores iguales a 0,000. Esto puede implicar que los sedimentos produjeron una reducción en la longitud larvaria.

El estudio de Soualili et al. (2008) documenta que la reducción menor al 10% en la longitud larval tras la exposición a sedimentos entra dentro de posible variabilidad natural o efectos leves. En este caso, se supera el umbral (18-34%), por lo que se podría suponer que la exposición de los sedimentos produce una alteración en la longitud de *P. lividus*. Estos valores, aunque no cumplen los criterios de toxicidad aguda, si reflejan un efecto negativo de los sedimentos sobre su crecimiento que no implica toxicidad en sí misma, sino posible relación con la composición propia del sedimento.

En cuanto al desarrollo larvario, en todas las muestras, así como el blanco, los embriones alcanzaron la etapa de larva plúteus, indicando un desarrollo óptimo en el periodo de exposición de 48 horas. Sin embargo, también se observaron en una proporción menor individuos de estadios anteriores, como blástula, gástrula o pre-plúteus, en las muestras M.1 a M.6. De acuerdo con los estudios previos, Beiras et al. (2012) y Soualili et al. (2008), la presencia de estados menos desarrollados de las larvas puede tener interpretaciones ligadas a efectos subletales no acompañadas de la inhibición del desarrollo y de mortalidad. Así pues, se detectan diferencias respecto al control, aún sin cumplir al igual que en el caso de longitud larvaria, los umbrales de toxicidad. De esta forma, se respalda la hipótesis de efectos adversos que alteran el desarrollo embrionario de *Paracentrotus lividus* tras la exposición a los sedimentos, sin vincularse a un efecto tóxico agudo.

La caracterización fisicoquímica del elutriado no muestra una relación clara que permita interpretar los resultados observados en los bioensayos, tanto para *Artemia franciscana* como *Paracentrotus lividus*. Las muestras M.3 y M.4 presentan mayor humedad, y solo la M.3 mayor conductividad. Sin embargo, la menor longitud larvaria se registró en M.2 y M.3, mientras que los valores más bajos de éxito de desarrollo corresponden a M.4 y M.5. Por otro lado, aunque M.3 presenta alta conductividad y humedad, ni la mortalidad en *A. franciscana* ni el éxito de desarrollo en *P. lividus*, fueron los más afectados. La menor alteración en términos generales medidos se presentó en M.6. Aunque M.1 mostró los valores fisicoquímicos que más cercanos a los del control, no se tradujo necesariamente en una menor alteración embrionaria.

De este modo, al analizar los resultados de la caracterización fisicoquímica de los sedimentos, se observa que no existe una relación clara y directa entre estos parámetros y las respuestas biológicas observadas. El estudio de Garmendia et al. (2009), señala la influencia directa de las propiedades fisicoquímicas en la toxicidad de los sedimentos, lo que sugiere que las observaciones en los bioensayos podrían derivarse de la combinación de las diversas condiciones fisicoquímicas, derivando en respuestas fisiológicas leves, aun sin detectar efectos agudos.

Como propuestas para futuras investigaciones, se podría profundizar en la caracterización química de los sedimentos e identificar posibles contaminantes absorbidos, responsables de los efectos subletales observados. Asimismo, podría utilizarse organismos como *Tisbe battagliai* para comparar respuestas y ampliar en la evaluación de la calidad de sedimentos (Conti et al., 2012).

6. CONCLUSIÓN

A partir del análisis de toxicidad de los sedimentos formados tras la DANA, evaluados con bioensayos con *Artemia franciscana* y *Paracentrotus lividus*, se obtienen las siguientes conclusiones:

- La validación del protocolo experimental con el tóxico de referencia, dicromato potásico ($K_2Cr_2O_7$), en el bioensayo de *A. franciscana* ratificó la sensibilidad y aplicación adecuada del método. La dosis letal 50 (DL50) obtenida, entra dentro del rango referenciado en estudios previos, validando el procedimiento.
- En el bioensayo con las muestras de sedimento en *A. franciscana*, la mortalidad observada es baja (5,75% como valor máximo), indicando nula toxicidad aguda en las muestras.
- En el bioensayo con las muestras para *P. lividus*, el desarrollo embrionario fue elevado en términos generales, con éxito de embriogénesis superior al 90% en todas las muestras, reforzando la idea de ausencia de toxicidad aguda.
- El desarrollo y longitud larvario presentó anomalías de las muestras con respecto al control, exponiendo una reducción relevante en la longitud y estadios embrionarios anteriores. Estos resultados sugieren un efecto subletal en el desarrollo de las larvas de *P. lividus*.
- La caracterización fisicoquímica de las muestras no indica una correlación clara y directa entre los parámetros fisicoquímicos y la respuesta biológica observada, como en la reducción de la longitud larvaria, lo que podría implicar factores más complejos.
- Los resultados de este estudio hacen notable la necesidad de estudios futuros que profundicen en la caracterización química de los sedimentos tras fenómenos meteorológicos extremos como el caso de la DANA.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agencia Estatal de Meteorología. (2024). Informe sobre el episodio meteorológico de precipitaciones torrenciales y persistentes ocasionadas por una DANA el día 29 de octubre de 2024. AEMET. <https://www.aemet.es/documentos/es/conocermas/recursos_en_linea/publicaciones_y_estudios/estudios/informe_episodio_dana_29_oct_2024.pdf> [Consulta: 26 de julio de 2025].

Agencia Estatal de Meteorología. (2024). Precipitación acumulada el 29 de octubre de 2024 [Mapa]. AEMET. <<https://www.aemet.es>> [Consulta: 26 de julio de 2025].

Agencia Estatal de Meteorología (AEMET). (2024). Avance climatológico de octubre de 2024 en la Comunitat Valenciana. <https://www.aemet.es/documentos/es/serviciosclimaticos/vigilancia_clima/resumenes_climat/ccaa/comunitat-valenciana/avance_climat_val_oct_2024.pdf> [Consulta: 26 de julio de 2025].

Agencia Estatal de Meteorología (AEMET). (2024). Balance climático de octubre de 2024. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO). <<https://www.miteco.gob.es/content/dam/miteco/es/prensa/202410%20Balance%20climatico.pdf>> [Consulta: 26 de julio de 2025].

APHA, AWWA, WEF. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (23rd Edition). American Public Health Association. Método 2540G: Determination of Moisture Content in Solid and Semi-solid Samples

APHA, AWWA, WEF. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (23rd Edition). American Public Health Association. Método 2540G: Fixed and Volatile Solids Ignition at 550°C.

APHA, AWWA, WEF. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, (23rd Edition). American Public Health Association. Método 4500-H⁺: pH Value.

APHA, AWWA, WEF. (2017). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, (23rd Edition). Método 2510: Conductivity.

Beiras, R., Bellas, J., Fernández, N., Lorenzo, J., & Cobelo-García, A. (2003). Assessment of coastal marine pollution in Galicia (NW Iberian Peninsula); metal concentrations in seawater, sediments and mussels (*Mytilus galloprovincialis*) versus embryo–larval bioassays using *Paracentrotus lividus* and *Ciona intestinalis*. *Investigación Ambiental Marina*, 56(4), 531-553. <[https://doi.org/10.1016/S0141-1136\(03\)00042-4](https://doi.org/10.1016/S0141-1136(03)00042-4)> [Consulta: 27 de julio de 2025].

Bernardo, G., De Gregorio, S., & Palmero, L. (2024). Editorial DANA: aprendiendo del pasado para construir responsablemente. *VITRUVIO*, 9 (2), 2-3 <https://iris.unibas.it/bitstream/11563/193255/1/editorial_vitruvio%20Vol%209%20N.o%202_2024.pdf> [Consulta: 27 de julio de 2025].

Boudouresque, C. F., & Verlaque, M. (2001). Ecology of *Paracentrotus lividus*. In *Developments in aquaculture and fisheries science* (pp. 177–216). <[https://doi.org/10.1016/s0167-9309\(01\)80013-2](https://doi.org/10.1016/s0167-9309(01)80013-2)> [Consulta: 27 de julio de 2025].

Brix, K. V., Cardwell, R. D., & Adams, W. J. (2003). Chronic toxicity of arsenic to the Great Salt Lake brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 54, 169–175.

Conti, G., Banni, M., Benedetti, M., Canepa, L., Carli, A., Conio, O., ... & Migliore, V. (2012). Development of a battery of ecotoxicological tests for the assessment of the quality of marine sediments. *Chemosphere*, 86(1), 108-115.

Cortés, AA, Sánchez-Fortún, S., García, M., Martínez, H., y Bartolomé, MC (2018). Evaluación toxicológica de mezclas binarias e individualmente de compuestos químicos utilizados en la desalinización por ósmosis inversa en nauplios de *Artemia franciscana*. *Revista Latinoamericana de Investigación Acuática*, 46 (4), 673-682.

Demarcación Hidrográfica del Júcar. (2025). Propuesta de plan para la recuperación y mejora de la resiliencia frente a las inundaciones en el territorio afectado por la DANA en la Comunidad Valenciana [Documento técnico]. Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico (MITECO). <<https://www.miteco.gob.es/content/dam/miteco/es/agua/participacion-publica/inundaciones/Propuesta%20plan%20resiliencia%20DANA%20CV%20consulta%20p%C3%ABlica.pdf>> [Consulta: 19 de julio de 2025].

Edición, F. (2002). Métodos para la medición de la toxicidad aguda de efluentes y aguas receptoras para organismos de agua dulce y marinos. *Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), Washington, D. C., EE. UU.* <https://www.epa.gov/sites/default/files/2015-08/documents/acute-freshwater-and-marine-wet-manual_2002.pdf> [Consulta: 19 de julio de 2025].

Gallegos-Reina, A. J. (2021). Inundaciones en el litoral mediterráneo español en el actual contexto de Cambio Climático: orientaciones para su análisis y gestión. Estudio en la cuenca del arroyo Piletas (Málaga).

Garaventa, F., Gambardella, C., Di Fino, A., Pittore, M., & Faimali, M. (2010). Swimming speed alteration of *Artemia* sp. and *Brachionus plicatilis* as a sub-lethal behavioural endpoint for ecotoxicological surveys. *Ecotoxicology*, 19(3), 512–519. <https://doi.org/10.1007/s10646-010-0461-8>

Garmendia, J.M., Menchaca, I., Belzunce, M.J y Revilla M. (2009). Protocolo del test de toxicidad de sedimentos marinos con larvas del erizo de mar *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816). *Revista de Investigación Marina*, 11, 1-25 pp

Gaspar Reyes, W., Niño Velásquez, A., Alejos Cabrera, R., & Ynga Huamán, G. (2021). Manual para la producción de *Artemia franciscana* como alimento para larvas y juveniles de peces. Informe Instituto del Mar del Perú, 48(1), 35–49. <<https://repositorio.imarpe.gob.pe/bitstream/20.500.12958/3531/1/Informe%2048-1%20Articulo8.pdf>> [Consulta: 27 de julio de 2025].

González Gómez, M. C. (2018). Toxicidad del clorpirifós y triclosán asociados a microplástico (cloruro de polivinilo) en la especie *Artemia salina* [Trabajo Fin de Máster, Universidad de Cádiz]. Universidad de Cádiz, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Área de Toxicología.

Jansà Clar, A. (2004). ¿ Qué es la gota fría?. Agencia Estatal de Meteorología. <https://www.mapa.gob.es/ministerio/pags/Biblioteca/Revistas/pdf_AM/AM_2004_36_59_62.pdf> [Consulta: 27 de julio de 2025].

Khosrovyan, A., & Kahru, A. (2003). The use of a brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay to assess the toxicity of diatom extracts and short chain aldehydes. *Toxicon*, 42(3), 301-306.

Kobayashi, N., & Okamura, H. (2004). Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects. *Quimosfera*, 55(10), 1403-1412. <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.11.052> > [Consulta: 27 de julio de 2025].

Libralato, G. (2014). The case of *Artemia* spp. in nanoecotoxicology. *Marine Environmental Research*, 101, 38-43. <<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2014.08.002> > [Consulta: 27 de julio de 2025].

Manfra, L., Savorelli, F., Di Lorenzo, B., Libralato, G., Comin, S., Conti, D., Floris, B., Francese, M., Gallo, M., Gartner, I., Guida, M., Leoni, T., Marino, G., Martelli, F., Palazzi, D., Prato, E., Righini, P., Rossi, E., Ghirardini, A. V., & Migliore, L. (2015). Intercalibration of ecotoxicity testing protocols with *Artemia franciscana*. *Ecological Indicators*, 57, 41-47. <<https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.04.021> > [Consulta: 27 de julio de 2025].

Martín León, F. (2019). Las gotas frías/DANAS. Ideas y conceptos básicos [Blog de AEMET]. Agencia Estatal de Meteorología. <https://repositorio.aemet.es/bitstream/20.500.11765/11719/1/Gotas_frias_blog_AEMET_2018_50_58.pdf > [Consulta: 26 de mayo de 2025].

Meteoclimática. (2025). *Olas de calor en el agua: así ha aumentado la temperatura del Mediterráneo en los últimos 40 años*. Aemetblog. <<https://aemetblog.es/2025/07/12/olas-de-calor-tambien-en-el-agua-asi-ha-aumentado-la-temperatura-del-mediterraneo-en-los-ultimos-40-anos/> > [Consulta: 26 de julio de 2025].

MicroBioTests Inc. (s.f.). *ARTOXKIT M™: Artemia toxicity screening test for estuarine and marine waters: Standard operational procedure*. Nazareth, Bélgica: MicroBioTests Inc.

Migliore, L., Civitareale, C., Brambilla, G., & Di Delupis, G. D. (1997). Toxicity of several important agricultural antibiotics to *Artemia*. *Water Research*, 31(7), 1801-1806. <[https://doi.org/10.1016/s0043-1354\(96\)00412-5](https://doi.org/10.1016/s0043-1354(96)00412-5) >

Ocaranza-Joya, V. S., Manjarrez-Alcivar, I., Ruiz-González, L. E., & Vega-Villasante, F. (2019). Sensitivity of different stages of *Artemia franciscana* to potassium dichromate. *ResearchGate*. <https://www.researchgate.net/publication/334051849_Sensitivity_of_different_stages_of_Artemia_franciscana_to_potassium_dichromate > [Consulta: 26 de julio de 2025].

Oria Iriarte, P. (2021) ¿Está aumentando la frecuencia o la intensidad de las precipitaciones extremas en el Mediterráneo? AEMET Blog. <<https://aemetblog.es/2021/05/02/esta-aumentando-la-frecuencia-o-la-intensidad-de-las-precipitaciones-extremas-en-el-mediterraneo/> > [Consulta: 26 de julio de 2025].

Ruiz-González, LE, Guzmán-Dávalos, L., Guerrero-Galván, SR, & Vega-Villasante, F. (2023). Hongos para vivir o morir: toxicidad de algunos Basidiomycota utilizando *Artemia franciscana*. *Revista Brasileña de Biología*, 83, e275156.

Ruiz, M. H. (2008). *Guía metodológica para la elaboración de cartografías de riesgos naturales en España*. Ministerio de la Vivienda.

Sarabia, R., Del Ramo, J., Varó, I., Díaz-Mayans, J., & Torreblanca, A. (2008). Sublethal zinc exposure has a detrimental effect on reproductive performance but not on the cyst hatching success of *Artemia parthenogenetica*. *The Science of the Total Environment*, 398(1–3), 48–52. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.03.002>

Savorelli, F., Palazzi, D., Gorbi, G., Invidia, M., Sei, S., Magaletti, E., Manfra, L., & Gelli, F. (2007). Set up of a standard methodology for 14-day bioassay on *Artemia franciscana* and *A. parthenogenetica*. *Biologia Ambientale*, 21, 27–36.

Soms Molina, P. (2021). Toxicidad de plásticos procedentes del mar mediante bioensayos con *Paracentrotus lividus*.

Soualili, D., Dubois, P., Gosselin, P., Pernet, P. y Guillou, M. (2008). Evaluación de la contaminación del agua de mar por metales pesados en las cercanías de Argel: uso del erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, como bioindicador. *Revista CIEM de Ciencias Marinas*, 65 (2), 132-139.

U.S. Environmental Protection Agency (USEPA). (2002). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms (5th ed., EPA-821-R-02-012, p. 266).

US EPA.(2025). *Superfund: Contaminated sediments* < <https://www.epa.gov/superfund/superfund-contaminated-sediments> > [Consulta: 20 de julio de 2025].

Vanhaecke, P., Persoone, G., Claus, C. y Sorgeloos, P. (1981). Propuesta para una prueba de toxicidad a corto plazo con nauplios de *Artemia*. *Ecotoxicología y seguridad ambiental*, 5 (3), 382-387. <https://www.academia.edu/download/96370581/0147-6513_2881_2990012-920221226-1-hvuih6.pdf> [Consulta: 27 de julio de 2025].

Volpi Ghirardini, A., Arizzi Novelli, A., & Tagliapietra, D. (2005). Sediment toxicity assessment in the Lagoon of Venice (Italy) using *Paracentrotus lividus* (Echinodermata: Echinoidea) fertilization and embryo bioassays. *Medio Ambiente Internacional*, 31(7), 1065-1077.< <https://doi.org/10.1016/j.envint.2005.05.017> > [Consulta: 27 de julio de 2025].

8. RELACIÓN DEL TRABAJO CON LOS OBJETIVOS DE DESARROLLO SOSTENIBLE DE LA AGENDA 2030

Tabla 18. Grado de relación del trabajo con los Objetivos de Desarrollo Sostenible de la Agenda 2030.

Objetivos de Desarrollo Sostenibles	Alto	Medio	Bajo	No procede
ODS 1. Fin de la pobreza				X
ODS 2. Hambre cero.				X
ODS 3. Salud y bienestar	X			
ODS 4. Educación de calidad				X
ODS 5. Igualdad de género				X
ODS 6. Agua limpia y saneamiento	X			
ODS 7. Energía asequible y no contaminante				X
ODS 8. Trabajo decente y crecimiento económico				X
ODS 9. Industria, innovación e infraestructuras				X
ODS 10. Reducción de las desigualdades.				X
ODS 11. Ciudades y comunidades sostenibles.	X			
ODS 12. Producción y consumo responsable.		X		
ODS 13. Acción por el clima.	X			
ODS 14. Vida submarina.		X		
ODS 15. Vida de ecosistemas terrestres.		X		
ODS 16. Paz, justicia e instituciones sólidas.				X
ODS 17. Alianzas para lograr objetivos				X

Este trabajo de fin de grado se alinea con diferentes apartados de los Objetivos de Desarrollo Sostenible (ODS) de la Agenda de 2030, destacando 4 de ellos que se relacionan de forma directa con la problemática del estudio:

El Objetivo 3, de Salud y Bienestar, debido a que la presencia de sedimentos potencialmente contaminados y tóxicos generados en el fenómeno meteorológico DANA supone un riesgo tanto para el medio ambiente como para la salud humana. La evaluación de la toxicidad es necesaria para prevenir efectos negativos sobre la sociedad en caso de que las aguas contaminadas puedan utilizarse en riego, consumo, etc. El Objetivo 6, de Agua limpia y saneamiento, dado que la contaminación de los sedimentos por la DANA puede afectar a las masas de agua superficiales y subterráneas. Concretamente, la caracterización fisicoquímica de los sedimentos permite identificar sus propiedades y la posible alteración sobre los recursos hídricos. El Objetivo 11, de Ciudades y comunidades sostenibles, ya que el área de estudio del trabajo se ubica en el municipio de Massanassa, de forma que se presentan los daños y vulnerabilidad de los núcleos urbanos ante fenómenos meteorológicos extremos. Así pues, el conocimiento extraído puede favorecer la planificación del territorio para reducir riesgos. El Objetivo 13, de Acción por el clima, puesto que el origen de la problemática ambiental abordada viene dado por la DANA, un evento climático extremo derivado por el cambio climático. Al analizar las consecuencias ambientales a nivel toxicológico, permite obtener conocimiento relacionado tanto en el ecosistema como en la población y plantear estrategias frente a futuros eventos meteorológicos.