

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIEROS
INDUSTRIALES Y DE TELECOMUNICACIÓN

UNIVERSIDAD DE CANTABRIA



Trabajo Fin de Grado

**EVALUACIÓN DE LA ACEPTABILIDAD
AMBIENTAL DE AAMS BASADOS EN RED
MUD MEDIANTE TRES ENSAYOS DE
ECOTOXICIDAD.**

**(Assessment of the environmental
acceptability of red mud–based AAMs using
three ecotoxicity tests).**

Para acceder al Título de

Graduada en Ingeniería Química

Autor: Evelyn Alaska Duarte Salazar

Septiembre 2025

TÍTULO	EVALUACIÓN DE LA ACEPTABILIDAD AMBIENTAL DE AAMS BASADOS EN RED MUD MEDIANTE TRES PRUEBAS DE ECOTOXICIDAD.		
AUTOR	EVELYN ALASKA DUARTE SALAZAR		
DIRECTOR/ES	EVA CIFRIÁN BEMPOSTA/VICTORIA MUÑOZ RUIZ		
TITULACIÓN	GRADO EN INGENIERÍA QUÍMICA	FECHA	09/09/2025

PALABRAS CLAVE

Red mud, AAM, lixiviación, ecotoxicidad, *Vibrio fischeri*, *Paracentrotus lividus*, *Artemia franciscana*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los arrecifes artificiales (ARs) son estructuras instaladas en el mar que tienen el propósito de generar hábitats artificiales para organismos acuáticos. El impacto ambiental positivo de los ARs depende principalmente de factores de diseño como la profundidad, la circulación del agua y los materiales utilizados. En las últimas décadas, se ha incrementado el uso innovador de materiales residuales en la construcción de ARs como los materiales activados alcalinamente (AAMs), reduciendo el consumo de recursos y energía, y, en consecuencia, las emisiones de gases de efecto invernadero. El análisis ecotoxicológico de los productos de construcción, entre los que se encuentran los AAMs, es un área relativamente poco explorada a nivel internacional. Recientemente se ha recomendado la realización de pruebas de ecotoxicidad acuática sobre productos de construcción para entornos de agua dulce. Sin embargo, los efectos biológicos de los materiales alternativos en el ecosistema marino aún no se consideran (Santos et al., 2023).

El presente Trabajo Fin de Grado, tiene como objetivo principal la evaluación del impacto ambiental de diferentes AAMs propuestos como materiales para arrecifes artificiales en el medio marino elaborados a partir de residuos tales como el red mud (RM), cenizas volantes (FA) y metacaolín (MK) (Gonçalves et al., 2024).

Para ello, se llevó a cabo un test de lixiviación y tres test de ecotoxicidad diferentes: la reducción de luminosidad de la bacteria marina *Vibrio fischeri* (Microtox®), el desarrollo larvario del erizo de mar *Paracentrotus lividus* e integrando como nueva alternativa de evaluación ambiental el test de supervivencia de nauplii de *Artemia franciscana*.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Se ha llevado a cabo una evaluación del impacto ambiental de las materias primas: red mud (RM), ceniza volante (FA) y metacaolín (MK) y de los AAMs obtenidos a partir de ellas, y que son utilizados para la fabricación de arrecifes artificiales (AR). La evaluación

se ha llevado a cabo a través de un ensayo de lixiviación y tres tests de ecotoxicidad, basados en el contacto con tres organismos del medio acuático diferentes.

Del ensayo de lixiviación se destaca que el RM, como materia prima, mostró la mayor movilidad de elementos (Cr, Hg, Se, Mo) superando el límite de residuos inertes y siendo la única materia prima en superar el límite de residuos no peligrosos para dos elementos (V y As). El MK supera el límite de inertes para el elemento Se. Todos los productos superan los límites establecidos para residuos inertes en el caso de elementos como As, Cr, Se, V y fluoruros (F⁻). Aun así, todos los valores se encuentran por debajo del límite para definir un residuo como peligroso, establecido por la Directiva 1999/31/CEE.

Debido a que en este estudio se evalúan matrices complejas, los tests de ecotoxicidad permiten trasladar estos resultados a un efecto sobre los organismos que habitan el medio acuático. El test de reducción de la luminiscencia de *Vibrio fischeri*, refleja que los productos no presentan toxicidad, con valores del parámetro LID inferiores a 8. El porcentaje de supervivencia de nauplii de *Artemia franciscana* tampoco demuestra toxicidad por parte de estas muestras. El desarrollo larvario del erizo de mar *Paracentrotus lividus* permite observar diferencias sobre el efecto producido entre las muestras, con valores de EC50 de 59%, 60,5% y 61,5% para las muestras G3.37FA, GMK y G2.27FA respectivamente en orden decreciente según su efecto sobre el desarrollo larvario. El producto G2.27FA que incorpora una combinación de las 3 materias primas con una proporción menor de ceniza volante pero mayor de red mud, en comparación con el producto G3.37FA, muestra los mejores resultados. También es importante destacar que, mientras el comportamiento de lixiviación no se refleja en la luminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri* ni afecta la supervivencia de nauplii de *Artemia franciscana*, los resultados del desarrollo larvario del erizo de mar *Paracentrotus lividus* muestran cierta consistencia con la movilidad de los elementos químicos estudiados (en particular la presencia de As). Por lo tanto, estos resultados respaldan el uso potencial del red mud como materia prima alternativa en la producción de ARs basados en AAMs, desde el punto de vista de la aceptabilidad ambiental. Además, se demuestra la conveniencia de realizar una evaluación ecotoxicológica que complemente el análisis químico.

BIBLIOGRAFÍA

Gonçalves, N. P. F., da Silva, E. F., Tarelho, L. A. C., Labrincha, J. A., & Novais, R. M. (2024). Simultaneous removal of multiple metal(loid)s and neutralization of acid mine drainage using 3D-printed bauxite-containing geopolymers. *Journal of Hazardous Materials*, 462.

Santos, J., Cifrian, E., Rodriguez-Romero, A., Yoris-Nobile, A. I., Blanco-Fernandez, E., Castro-Fresno, D., & Andres, A. (2023). Assessment of the environmental acceptability of potential artificial reef materials using two ecotoxicity tests: Luminescent bacteria and sea urchin embryogenesis. *Chemosphere*, 310.

TÍTULO	ASSESSMENT OF THE ENVIRONMENTAL ACCEPTABILITY OF RED MUD-BASED AAMS USING THREE ECOTOXICITY TESTS.		
AUTOR	EVELYN ALASKA DUARTE SALAZAR		
DIRECTOR/S	EVA CIFRIÁN BEMPOSTA/VICTORIA MUÑOZ RUIZ		
TITULACIÓN	CHEMICAL ENGINEERING DEGREE	FECHA	09/09/2025

KEYWORDS

Red mud, AAM, leaching, ecotoxicity, *Vibrio fischeri*, sea urchin, *Artemia franciscana*.

SCOPE

Artificial reefs (ARs) are structures installed in the sea with the purpose of generating artificial habitats for aquatic organisms. The positive environmental impact of ARs depends mainly on design factors such as depth, water circulation, and the materials used. In recent decades, the innovative use of waste materials in the construction of ARs has increased, such as alkali-activated materials (AAMs), which reduce resource and energy consumption and, consequently, greenhouse gas emissions.

The ecotoxicological analysis of construction products, including AAMs, is a relatively underexplored area at the international level. Recently, it has been recommended to carry out aquatic ecotoxicity tests on construction products intended for freshwater environments. However, the biological effects of alternative materials in the marine ecosystem are still not considered (Santos et al., 2023).

The main objective of this Final Degree Project is to assess the environmental impact of different AAMs proposed as materials for artificial reefs in the marine environment, produced from wastes such as red mud (RM), fly ash (FA), and metakaolin (MK) (Gonçalves et al., 2024).

To this end, a leaching test and three different ecotoxicity tests were carried out: the reduction in bioluminescence of the marine bacterium *Vibrio fischeri* (Microtox®), the larval development of the sea urchin *Paracentrotus lividus*, and, as a new alternative for environmental assessment, the survival test of *Artemia franciscana* nauplii.

RESULTS/CONCLUSIONS

An environmental impact assessment has been carried out on raw materials: red mud (RM), fly ash (FA) and metakaolin (MK); and on the AAMs obtained from them, which are used in the manufacture of artificial reefs (ARs). The assessment was conducted through a leaching test and three ecotoxicity tests, based on contact with three different aquatic organisms.

From the leaching test, it is noteworthy that RM, as a raw material, presented the highest mobility of elements (Cr, Hg, Se, Mo), exceeding the inert waste limit and being the only raw material to surpass the non-hazardous waste limit for two elements (V and As). MK exceeded the inert waste limit for Se. All products exceeded the established limits for inert waste in the case of elements such as As, Cr, Se, V, and fluorides (F⁻). Nonetheless, all values remain below the threshold defining hazardous waste, as established by Directive 1999/31/EC.

Since this study evaluates complex matrices, the ecotoxicity tests make it possible to translate these results into an effect on organisms from the aquatic environment. The *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition test indicated that the products do not present toxicity, with LID parameter values below 8. The survival rate of *Artemia franciscana* nauplii likewise did not demonstrate toxicity in these samples. The larval development test of the sea urchin *Paracentrotus lividus* revealed differences in the effects produced by the samples, with EC50 values of 59%, 60.5%, and 61.5% for samples G3.37FA, GMK, and G2.27FA, respectively, in decreasing order of effect on larval development. The product G2.27FA, which incorporates a combination of the three raw materials with a lower proportion of fly ash but a higher proportion of red mud compared to product G3.37FA, showed the best results.

It is also important to highlight that, while leaching behaviour was not reflected in the *Vibrio fischeri* bioluminescence test nor did it affect the survival of *Artemia franciscana* nauplii, the results of the sea urchin *Paracentrotus lividus* larval development test showed some consistency with the mobility of the chemical elements studied (in particular the presence of As). Therefore, these results support the potential use of red mud as an alternative raw material in the production of ARs based on AAMs, from the perspective of environmental acceptability. Moreover, they demonstrate the suitability of performing an ecotoxicological evaluation to complement chemical analysis.

REFERENCES

- Gonçalves, N. P. F., da Silva, E. F., Tarelho, L. A. C., Labrincha, J. A., & Novais, R. M. (2024). Simultaneous removal of multiple metal(loid)s and neutralization of acid mine drainage using 3D-printed bauxite-containing geopolymers. *Journal of Hazardous Materials*, 462.
- Santos, J., Cifrian, E., Rodriguez-Romero, A., Yoris-Nobile, A. I., Blanco-Fernandez, E., Castro-Fresno, D., & Andres, A. (2023). Assessment of the environmental acceptability of potential artificial reef materials using two ecotoxicity tests: Luminescent bacteria and sea urchin embryogenesis. *Chemosphere*, 310.

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	LOS ARRECIFES ARTIFICIALES (ARs).....	1
1.2.	MATERIALES ACTIVADOS ALCALINAMENTE (AAM) COMO ALTERNATIVA DE CONSTRUCCIÓN.....	2
1.3.	RED MUD COMO MATERIA PRIMA ALTERNATIVA EN AAMs.	3
1.4.	ESTUDIO DEL IMPACTO AMBIENTAL DE LOS MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN5	
1.4.1.	Ensayo de lixiviación	5
1.4.2.	Test de ecotoxicidad	6
1.5.	OBJETIVOS.....	8
2.	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	9
2.1.	MATERIALES.....	9
2.1.1.	Descripción de los materiales.....	9
2.2.	ENSAYO DE LIXIVACIÓN	12
2.2.1.	Ensayo de lixiviación con agua desionizada.	13
2.2.2.	Ensayo de lixiviación con agua de mar filtrada.	15
2.2.3.	Análisis químico	16
2.3.	TEST ECOTOXICIDAD: REDUCCIÓN DE LA LUMINISCENCIA DE <i>VIBRIO FISCHERI</i> 16	
2.3.1.	Obtención y activación de la bacteria	17
2.3.2.	Preparación del test.....	17
2.3.3.	Puesta en contacto	17
2.3.4.	Análisis de resultados EC20, EC50.	18
2.4.	TEST ECOTOXICIDAD: SUPERVIVENCIA DE NAUPLII DE <i>ARTEMIA FRANCISCANA</i> 18	
2.4.1.	Preparación del test.....	19
2.4.2.	Eclosión de los huevos de artemia franciscana.	19
2.4.3.	Parámetros controlables y medidos.....	20
2.4.4.	Preparación de las diluciones de lixiviado.....	21
2.4.5.	Puesta en contacto	21
2.5.	TEST ECOTOXICIDAD: DESARROLLO LARVARIO DEL ERIZO DE MAR <i>PARACENTROTUS LIVIDUS</i>	22
2.5.1.	Preparación del test.....	22

2.5.2.	Procedimiento de fertilización	23
2.5.3.	Puesta en contacto	23
2.6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	25
3.	RESULTADOS.....	26
3.1.	LIXIVIACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA	26
3.2.	REDUCCIÓN DE LA LUMINISCENCIA DE <i>VIBRIO FISCHERI</i>	29
3.3.	SUPERVIVENCIA DE NAUPLII DE <i>ARTEMIA FRANCISCANA</i>	32
3.4.	DESARROLLO LARVARIO DEL ERIZO DE MAR <i>PARACENTROTUS LIVIDUS</i>	34
3.5.	COMPARACIÓN DE RESULTADOS	37
4.	CONCLUSIONES.....	38
5.	BIBLIOGRAFÍA	39

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Principales elementos de óxido de materias primas (%)	10
Tabla 2: Composición de cada producto analizado	12
Tabla 3: Concentración de contaminantes en los lixiviados (EN 12457-4) de las materias primas (MK, FA, RM) y productos (GMK, G2.27FA, G3.37FA).....	28
Tabla 4: Resultados de EC20. LID y EC50 para materias primas (MK, FA, RM) y productos (GMK, G2.27FA, G3.37FA) a los 15 min de exposición.....	29
Tabla 5: Resultados de EC20. LID y EC50 para materias primas (MK, FA, RM) y productos (GMK, G2.27FA, G3.37FA) a los 30 min de exposición.....	30
Tabla 6: Valores de EC50 y EC20 para los diferentes productos analizados expresados como porcentaje.....	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Metodología experimental.	9
Figura 2: Materias primas en orden: MK, FA, RM.....	10
Figura 3: Productos en orden: GMK, G2.27FA, G2.37FA	10
Figura 4. Resultados de DRX: FA, RM y MK.....	11
Figura 5: Diagrama general del ensayo de lixiviación.....	13
Figura 6: Equipo de purificación de agua. a) Módulo de agua tipo III b) Módulo de agua tipo I.	14
Figura 7. Rotador o agitador usando en el ensayo de lixiviación	14
Figura 8. Equipo de filtración usado en el ensayo de lixiviación	15
Figura 9 : Analizador de toxicidad modelo MICROTOX LX.	16
Figura 10: Diagrama general del test supervivencia de nauplii de <i>Artemia franciscana</i>	18
Figura 11: Incubación de huevos en baño de agua de mar.	19
Figura 12. Ciclo de vida de <i>Artemia</i> y duración de sus etapas de desarrollo.	20
Figura 13: Nauplii en fase instar II y III.	20
Figura 14: Lupa y vista de la <i>Artemia franciscana</i> a través del lente.	22
Figura 15: Diagrama general del test de desarrollo larvario <i>Paracentrotus lividus</i>	22
Figura 16: Frascos con la dilución seleccionada con 500 huevos aproximadamente.....	24
Figura 17: Clasificación propuesta de los niveles de toxicidad en larvas de erizo de mar para la evaluación de los materiales analizados.	24
Figura 18: Resultados del test reducción de la emisión de luz de <i>Vibrio fischeri</i> de materias primas(MK, FA, RM) y productos(GMK, G2.27FA, G3.37FA), expresados como porcentaje de reducción de la emisión de luz de <i>Vibrio fischeri</i> después de 15 minutos de exposición, en función de la concentración de lixiviado con su correspondiente desviación.....	30
Figura 19: Resultados del test reducción de la emisión de luz de <i>Vibrio fischeri</i> de materias primas(MK, FA, RM) y productos(GMK, G2.27FA, G3.37FA), expresados como porcentaje de reducción de la emisión de luz de <i>Vibrio fischeri</i> después de 30 minutos de exposición, en función de la concentración de lixiviado con su correspondiente desviación.....	31
Figura 20: Curvas dosis-respuesta que muestran la supervivencia de nauplii durante 24 y 48 h a las diferentes concentraciones de lixiviado de materias primas (MK, FA, RM) y productos (GMK, G2.27FA, G3.37FA)	33
Figura 21: Resultados del test para el producto GMK de acuerdo con la clasificación de endpoints propuesta. Los asteriscos se refieren a diferencias significativas en el porcentaje de población en el nivel 0 de toxicidad respecto al control ($p < 0,05^*$).	34
Figura 22: Resultados del test para el producto G2.27FA de acuerdo con la clasificación de endpoints propuesta. Los asteriscos se refieren a diferencias significativas en el porcentaje de población en el nivel 0 de toxicidad respecto al control ($p < 0,05^*$).	35
Figura 23: Resultados del test para el producto G3.37FA de acuerdo con la clasificación de endpoints propuesta. Los asteriscos se refieren a diferencias significativas en el porcentaje de población en el nivel 0 de toxicidad respecto al control ($p < 0,05^*$).	35
Figura 24: Curvas dosis-respuesta del desarrollo larvario respecto al nivel 0.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

Siglas	Significado en inglés	Significado en castellano
ARs	Artificial reefs	Arrecifes artificiales
RM	Red mud	Red mud
AAM	Alkali-Activated Materials	Materiales activados alcalinamente
MK	Metakaolin	Metacaolín
FA	Fly Ash	Ceniza volante
SW	Seawater	Agua de mar
DRX	Drx x-ray diffraction	Difracción de rayos x
GMK	Metakaolin AAM	AAM de Metacaolín
G2.27FA	AAM based on red mud, metakaolin, and fly ash, with a fly ash content of 2.27% by weight	AAM a base de Red mud, metacaolín y ceniza volante con un contenido de ceniza volante del 2.27% en peso
G3.37FA	AAM based on red mud, metakaolin, and fly ash, with a fly ash content of 3.37% by weight	AAM a base de Red mud, metacaolín y ceniza volante con un contenido de ceniza volante del 3.37% en peso
F ⁻	Flouride	Fluoruro
SO ₄ ⁻²	Sulfate	Sulfato
Cl ⁻	Chloride	Cloruro
CC	Control	Control
PEG	Polyethylene Glycol	Polietilenglicol
E50	Effective Concentration 50	Concentración efectiva 50
LID	Lowest Ineffective Dilution	Menor dilución efectiva

1. INTRODUCCIÓN

1.1. LOS ARRECIFES ARTIFICIALES (ARs)

Los ecosistemas marinos son altamente sensibles al impacto de factores externos, incluido el cambio climático y la contaminación marina. Estos contaminantes marinos existen en muchas formas, como residuos sólidos (plásticos), enriquecimiento de nutrientes (eutrofización), productos químicos tóxicos, descargas de aguas residuales sin tratar, derrames de petróleo, redes de pesca abandonadas y, más recientemente, los desechos de mascarillas de la pandemia de COVID-19 (Li et al., 2016). Estos contaminantes amenazan la diversidad marina de las zonas costeras y oceánicas y, en consecuencia, afectan su productividad (Dharmaraj et al., 2021). En este sentido, los arrecifes artificiales (ARs) se crean para mejorar el medio ambiente, aumentar la productividad de los ecosistemas marinos y su diversidad. Estas estructuras instaladas en el mar tienen el propósito de generar hábitats artificiales para organismos acuáticos. El impacto ambiental positivo de los ARs depende principalmente de factores de diseño como la profundidad, la circulación del agua y los materiales utilizados (Carral et al., 2020).

Por otro lado, en el contexto de las convenciones internacionales para la protección del medio marino, se considera que los ARs son un “conjunto de elementos, formados por diversos materiales inertes y con distintas formas, que se distribuyen sobre una superficie delimitada del lecho marino con el fin de proteger, regenerar y desarrollar poblaciones de especies de interés pesquero” (Lima et al., 2019; Reis et al., 2021; Suzdaleva y Beznosov, 2021). En cualquier caso, es necesario enfatizar que cualquier material inerte que se utilice para la creación de un arrecife artificial debe ser previamente evaluado de acuerdo con los criterios de las “Directrices Específicas para la Evaluación de Material Geológico Inerte, Inorgánico” desarrolladas por el Convenio de Londres (UNEP, 2009). Para los fines de estas directrices, los materiales inertes son aquellos que no causan contaminación mediante lixiviación, deterioro fisicoquímico y/o actividad biológica.

De los diferentes efectos ambientales que un arrecife artificial puede causar en el medio marino, se destaca el efecto sobre las comunidades biológicas, es decir, las especies que

colonizarán los arrecifes (Rouse et al., 2020). Por lo tanto, es necesario abordar el estudio de estas alteraciones derivadas tanto de la instalación de las estructuras como de la presencia de los arrecifes en el entorno marino, ya que los ARs en general pueden proporcionar refugio y alimento a muchas especies bénticas y pelágicas, además de áreas de cría, desove, etc. (UNEP, 2012)

En las últimas décadas, se ha incrementado el uso innovador de materiales residuales en la construcción de ARs en el marco de los Objetivos de Desarrollo Sostenible, reduciendo el consumo de recursos y energía, y, en consecuencia, las emisiones de gases de efecto invernadero (Xu et al., 2019; Carral et al., 2020; Goelz et al., 2020; Kong et al., 2022). En este contexto, estas estructuras se denominan arrecifes artificiales verdes, es decir, arrecifes artificiales ambientalmente sostenibles adaptados al principio fundamental de la economía circular, que consiste en cerrar y reducir los flujos de energía y materiales (Carral et al., 2020; Ellen MacArthur Foundation, 2019; Galdo et al., 2022). En relación con la verificación de su repercusión en la biosfera, es necesario evaluar el impacto ambiental en todas las etapas de su ciclo de vida. Ya que, en la práctica, solo se consideran los aspectos positivos de los ARs a corto plazo, mientras que los aspectos negativos, que suelen aparecer a largo plazo, son ignorados (Nagalakshmi et al., 2021; Suzdaleva y Beznosov, 2021).

1.2. MATERIALES ACTIVADOS ALCALINAMENTE (AAM) COMO ALTERNATIVA DE CONSTRUCCIÓN.

Se espera que la demanda mundial de cemento para el año 2050 sea de aproximadamente 5.0 mil millones de toneladas y que la principal emisión de gases de efecto invernadero, el CO₂, alcance alrededor de 4.0 gigatoneladas (provenientes de la industria cementera), lo que representa un 5 por ciento del total de las emisiones globales de CO₂ y podría provocar un grave calentamiento global y cambio climático. Para reducir estos efectos y promover el desarrollo de infraestructuras sostenibles, es necesario encontrar una alternativa al hormigón de cemento Portland. Los subproductos de fabricación como las cenizas volantes (FA) de las plantas termoeléctricas, el Red mud (RM) de las industrias de producción de alúmina, la escoria granulada de alto horno molida (GGBS) de las industrias siderúrgicas, entre otros, están

causando contaminación del aire, contaminación de aguas subterráneas, riesgos para la salud y ocupan valiosos recursos de suelo. Los subproductos industriales mencionados, junto con la adición de soluciones activadoras alcalinas, favorecen la fabricación de hormigón geopolimérico (alternativo al hormigón de cemento Portland). Los AAMs, también conocidos como polímeros inorgánicos, tienen propiedades reconocidas como adsorbentes de metales pesados debido a su estabilidad mecánica y química, bajo costo y bajo impacto energético durante el proceso de fabricación. Los AAMs se preparan mediante reacciones de copolimerización a través de la activación alcalina de precursores aluminosilicatados, como la metacaolinita disponible comercialmente y residuos como cenizas volantes o escoria. (Gonçalves et al., 2024).

1.3. RED MUD COMO MATERIA PRIMA ALTERNATIVA EN AAMs.

El RM es un subproducto industrial generado en el proceso de refinado de la bauxita. Aproximadamente entre 0,8 y 1,5 toneladas de red mud se producen por cada tonelada de Al_2O_3 . El acopio global de red mud ha superado los cuatro mil millones de toneladas, lo que representa riesgos ambientales significativos (Cui et al., 2024). Recientemente, el residuo de bauxita, también se ha explorado para la preparación de AAMs. El RM, además, se forma en cantidades masivas durante la producción de alúmina mediante el proceso Bayer. Por cada tonelada de alúmina extraída se generan alrededor de 0.8 a 1.5 toneladas de RM, lo que representó una producción de más de 150 millones de toneladas solo en 2020 y un acumulado estimado de 4 mil millones de toneladas en 2022. Debido a su alta alcalinidad (pH 9–13) y composición química, su reciclaje y valorización es complejo, por lo que actualmente el RM se acumula en gigantescos depósitos de almacenamiento que representan una amenaza para los entornos circundantes. Además, su inclusión como recurso aprovechable en la industria de la construcción, conforme a la normativa europea sobre End of Waste, refuerza el interés por su valorización en aplicaciones sostenibles en el marco europeo de residuos (Orveillon et al., 2022).

La composición química del red mud incluye principalmente Fe_2O_3 , Al_2O_3 y SiO_2 . Además, se encuentran metales pesados y elementos radiactivos como Th y U; por lo tanto, el red mud se caracteriza por su fuerte alcalinidad, alta salinidad y toxicidad ecológica

potencial. Actualmente, el principal método para eliminar este residuo sólido es mediante el vertedero. Sin embargo, esta práctica consume grandes extensiones de terreno y, debido a su alta alcalinidad y a los metales pesados presentes, el red mud puede contaminar suelos y aguas subterráneas, generando peligros ambientales (Khairul et al., 2019; Li, Dong, et al., 2025).

A nivel mundial, países como Australia, Canadá, India y Turquía presentan tasas de aprovechamiento del red mud inferiores al 10 %. En 2023, China produjo más de 100 millones de toneladas de red mud, de las cuales solo se reutilizaron alrededor de 10 millones. Por ello, para el desarrollo sostenible de la industria global de la alúmina, incrementar la valorización del red mud es un factor crítico (Liu et al., 2014).

Durante las últimas décadas, la utilización del red mud ha sido ampliamente investigada. Principalmente, el reciclaje y la reutilización incluyen la extracción de elementos metálicos valiosos como hierro, aluminio y metales raros (Deng et al., 2022; Jovičević-Klug et al., 2024; Pan et al., 2023; Wu et al., 2024). En particular, se propuso un método de reducción basado en plasma de hidrógeno con el que se obtuvieron productos de Fe de alta pureza (95 % en peso de Fe) y con presencia insignificante de elementos perjudiciales, permitiendo su uso directo en la siderurgia. Por otro lado, se ha estudiado el uso del red mud en materiales de construcción. Por ejemplo, se probó el red mud junto con polvo de ganga de carbón como sustitutos del cemento, observándose que la combinación mejoró significativamente la resistencia y la porosidad del hormigón. Se ha analizado el aprovechamiento de su estructura porosa en el diseño de materiales ecológicos para el tratamiento de aguas residuales y la remediación de suelos contaminados (Li et al., 2024; Liu et al., 2024; Xu et al., 2023; Zhao et al., 2023). Se estima que la capacidad de captura de carbono del red mud varía entre 5 y 175 g de CO₂ por kg de red mud, dependiendo de su composición y de la vía de carbonatación empleada.

Entre estas alternativas, el déficit actual de recursos de mineral de hierro en la industria siderúrgica ha despertado un gran interés en las tecnologías destinadas a recuperar hierro a partir del red mud (Du et al., 2024; Liu et al., 2021). La lixiviación ácida ha sido

ampliamente estudiada para la recuperación de Fe, pero su eficiencia se ve limitada por las capas pasivas formadas por los óxidos de hierro.

Por otro lado, la sinterización como método de activación térmica permite su aplicación en materiales de construcción. Sin embargo, estos enfoques no resuelven suficientemente el incremento continuo de las existencias debido a la limitada demanda del mercado. A pesar de la abundante investigación, las estrategias actuales de utilización del red mud enfrentan desafíos significativos (Li et al., 2025).

1.4. ESTUDIO DEL IMPACTO AMBIENTAL DE LOS MATERIALES DE CONSTRUCCIÓN

1.4.1. Ensayo de lixiviación

En los diferentes países europeos se han desarrollado ensayos para caracterizar y evaluar los constituyentes que pueden lixivarse de los materiales de construcción. Se considera la liberación de constituyentes solubles, al ponerse en contacto con agua, como el principal mecanismo de liberalización que puede originar un riesgo potencial para el medio ambiente durante el ciclo de vida del producto.

Estos ensayos están destinados a identificar las propiedades de los lixiviados de los residuos. Las simplificaciones son necesarias debido a la complejidad de los procesos de lixiviación todos los aspectos relevantes del comportamiento de la lixiviación pueden recogerse en una norma (CEN, 2002). Los ensayos de caracterización de los residuos y su comportamiento se pueden dividir generalmente en tres categorías:

1. Los ensayos de “caracterización básica” se emplean para obtener información sobre el comportamiento de la lixiviación a corto y largo plazo y sobre las propiedades características de los residuos. En estos ensayos se indican las relaciones líquido/sólido (L/S), composición del lixiviado, los factores que controlan la capacidad para lixiviar como el pH, potencial redox, capacidad de complejación y los parámetros físicos.
2. Los ensayos de “conformidad” se emplean para determinar si el residuo cumple con los valores de referencia específicos. El ensayo se centra en variables clave y en el comportamiento de lixiviación identificado en los ensayos de caracterización básica.

3. Los ensayos de “verificación in situ” se emplean como una forma rápida de confirmar que el residuo es el mismo que el que ha sido sometido al ensayo(s) de conformidad.

1.4.2. Test de ecotoxicidad

La ecotoxicidad es uno de los indicadores que puede mostrar hasta qué punto los organismos vivos o el ecosistema en su conjunto pueden verse afectados por el uso de un material alternativo (Mariaková et al., 2021). Las pruebas de ecotoxicidad tienen la ventaja de integrar los efectos de todas las sustancias peligrosas, incluidos los efectos aditivos, sinérgicos y antagónicos (Directorate-General for Health and Consumers., 2013). Aunque en la literatura científica se reportan muchos métodos ecotoxicológicos que pueden usarse para evaluar los posibles efectos del estrés químico en organismos bénticos (Rodrigues et al., 2017); (Guo et al., 2021), no existe un organismo capaz de probar todos los efectos posibles en el ecosistema. En la práctica, solo se pueden probar algunas especies (“organismo modelo” o de referencia) que representen funciones ecológicas relevantes (AENOR, 2017).. Sin embargo, para garantizar la relevancia ecológica, además de una adecuada selección de especies, deben considerarse otros aspectos como la elección de respuestas de puntos finales apropiadas que permitan conocer también cambios subletales relevantes, por ejemplo, respuestas de biomarcadores (Hook et al., 2014). Muchos estudios han aplicado una estrategia de pruebas que combina lixiviación con pruebas de ecotoxicidad para caracterizar suelos, sedimentos o sitios contaminados, así como para clasificar residuos según la propiedad de peligro H14 (residuos ecotóxicos) en el marco regulador europeo (Directiva 2008/98/CE) y más recientemente para evaluar el impacto ambiental de productos de construcción (Stiernström et al., 2014); (Bandarra et al., 2020).

Entre los test más empleados para evaluar la toxicidad se encuentran:

Test de bioluminiscencia

Se trata de uno de los test de ecotoxicidad más utilizados. Consiste en observar la inhibición de la luminiscencia de un cultivo de bacterias bioluminiscentes (*Vibrio fischeri*

), que emiten luz cuando son estimuladas por ciertas condiciones específicas, como consecuencia de la presencia de productos tóxicos.

Test de inhibición de crecimiento

En esta prueba, se exponen diversos cultivos como las algas verdes unicelulares, diatomeas y cianobacterias seleccionadas en fase exponencial de crecimiento a diversas concentraciones de una sustancia de ensayo. Se incuban durante un periodo de tiempo determinado, monitoreando la densidad celular y la inhibición del crecimiento en comparación con un cultivo control. Las normas ISO 8692:2012 y las directrices de la UE 440/2008 recomiendan el uso de algas como *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*) y *Desmodesmus subspicatus* (*Scenedesmus subspicatus*). La OECD 201:2011 también considera adecuadas especies como *Selenastrum capricornutum*, *Scenedesmus subspicatus*, *Navicula pelliculosa* y ciertas cianobacterias. La norma ISO 6341:2012 emplea *Daphnia magna* para el ensayo de inhibición de crecimiento de algas.

Test de mortalidad

Estos ensayos se basan en la exposición de los organismos seleccionados a diferentes concentraciones de la sustancia de ensayo durante un período de tiempo específico, observándose los efectos sobre la supervivencia y el comportamiento de los organismos expuestos. La norma ISO 15088:2013 proporciona un método estandarizado para evaluar la toxicidad aguda de muestras de agua y productos químicos mediante pruebas con *Danio rerio* (pez cebra).

Test de crecimiento

Para la realización de este test, se exponen plántulas a diferentes concentraciones de una sustancia química, mezcladas con suelo, y se monitorea el crecimiento de las raíces durante un período de tiempo determinado. Se observan los efectos de la sustancia química en el crecimiento de las plántulas y se comparan con un control no expuesto. La norma ISO 11269-2:2012, proporciona un método detallado para realizar pruebas de toxicidad en el suelo utilizando plántulas de *Brassica rapa*.

Test de comportamiento.

Esta prueba evalúa la toxicidad del suelo mediante la determinación de la reproducción y supervivencia de las lombrices *Eisenia fétida* (ISO 17512-2:2008) expuestas a sustancias químicas en el suelo, lo que proporciona información sobre la toxicidad del suelo para estos organismos.

Hasta la fecha, solo se han realizado pocos estudios que usen un enfoque ecotoxicológico para evaluar la toxicidad potencial de materiales de construcción en el medio acuático. Sin embargo, no existe información suficiente acerca de estudios sobre el efecto tóxico de nuevos productos de construcción basados en residuos para uso en ecosistemas marinos.

1.5. OBJETIVOS

El presente Trabajo Fin de Grado, tiene como objetivo principal la evaluación del impacto ambiental de diferentes AAMs propuestos como materiales para arrecifes artificiales en el medio marino elaborados a partir de residuos tales como el red mud (RM), cenizas volantes (FA) y metacaolín (MK).

Para ello se llevarán a cabo los siguientes objetivos específicos:

- Análisis químico de las materias primas y productos en base al ensayo de lixiviación estático de equilibrio UNE EN-12457-4 empleando agua desionizada como agente lixivante.
- Evaluación de la toxicidad de materias primas y productos mediante el test de ecotoxicidad de reducción de la luminiscencia de *Vibrio fischeri*, regulado por la norma UNE-EN ISO 11348-3.
- Evaluación de la toxicidad de materias primas y productos mediante el test de ecotoxicidad de supervivencia de nauplii de *Artemia franciscana*.
- Evaluación de la toxicidad de productos mediante el test de ecotoxicidad de desarrollo larvario del erizo de mar *Paracentrotus lividus*.
- Comparación de los resultados de los test aplicados.
-

2. METODOLOGIA EXPERIMENTAL

La metodología experimental seguida en este Trabajo Fin de Grado se recoge de manera general en la Figura 1 en forma de diagrama de bloques.

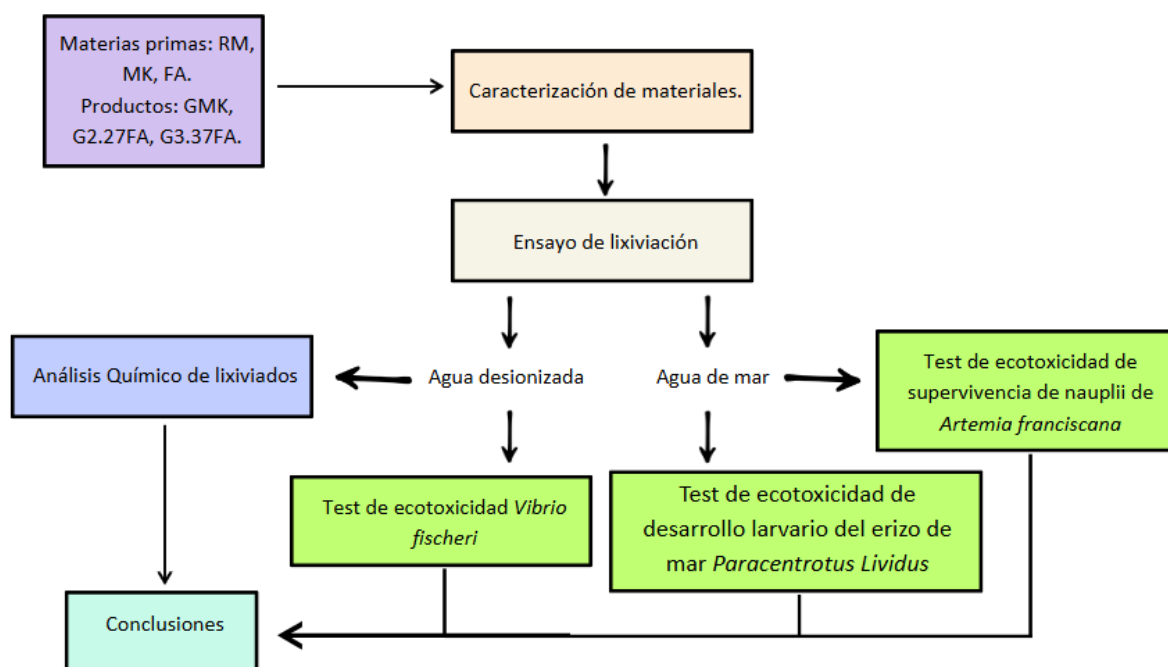


Figura 1: Metodología experimental.

2.1. MATERIALES

2.1.1. Descripción de los materiales

Las materias primas y los productos utilizados se describen a continuación y se muestran en la Figura 2 y 3, todos ellos proporcionados por la Universidad de Aveiro (Portugal):

- **Red mud (RM)** es uno de los desechos industriales generados durante la producción de alúmina, que es la materia prima para la fabricación de aluminio.
- **Fly-Ash (FA)** que es uno de los residuos sólidos industriales generados por las plantas termoeléctricas a base de carbón.
- **Polvo comercial de metacaolín (MK)** proporcionado por la Universidad de Aveiro (Portugal).

- AAMs de distintas proporciones a base de MK, RM Y FA (GMK, G2.27FA y G3.37FA).



Figura 2: Materias primas en orden: MK, FA, RM



Figura 3: Productos en orden: GMK, G2.27FA, G2.37FA

Caracterización fisicoquímica de las materias primas

La composición de las materias primas expresadas como elementos de óxido se muestran en la Tabla 1, donde se pueden observar los resultados de la fluorescencia de rayos X (XRF). Como puede verse, el RM está compuesto principalmente por Fe_2O_3 . El FA, tiene en su mayoría SiO_2 y Al_2O_3 . Respecto a la MK, su composición es principalmente rica en SiO_2 y Al_2O_3 . Finalmente, el MK está compuesto por SiO_2 y Al_2O_3 . En cada caso, se puede observar que dichas materias primas poseen una gran cantidad de SiO_2 y Al_2O_3 .

Tabla 1. Principales elementos de óxido de materias primas (%)

Muestra	SiO_2	CaO	Al_2O_3	Na_2O	K_2O	Fe_2O_3	TiO_2
RM	9.99	8.74	18.6	5.64	0.11	40.2	5.55
FA	50.6	13.1	14.6	1.03	5.76	5.42	0.88
MK	52.1	0.13	40.1	0.07	1.08	1.85	1.97

Caracterización mineralógica de las materias primas

El análisis mineralógico por difracción de rayos X (DRX) que se muestra en la Figura 4 representa en un mismo grafico para todas las materias primas estudiadas, en color morado tenemos al FA que demuestra que las principales fases cristalinas están formadas por compuestos como el Cuarzo (SiO_2), Calcita (CaCO_3), Moscovita ($\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$) y Rutilo (TiO_2). En color rojo el RM, éste muestra la presencia de Zeolita (Generalmente: $\text{M}_x/n[\text{Al}_x\text{Si}_y\text{O}_2(x+y)] \cdot m\text{H}_2\text{O}$, esto varía según el tipo, pero la base es un aluminosilicato hidratado), Hematita (Fe_2O_3) y otros compuestos como la Boehmita o Diasporo ($\text{AlO}(\text{OH})$) y en menor cantidad al igual que el FA muestra señales de Rutilo (TiO_2). Por último, en color verde al MK que destaca por tener como compuestos principales al Cuarzo (SiO_2), Moscovita ($\text{KAl}_2(\text{AlSi}_3\text{O}_{10})(\text{OH})_2$) y en menor proporción a la Anatasa (TiO_2).

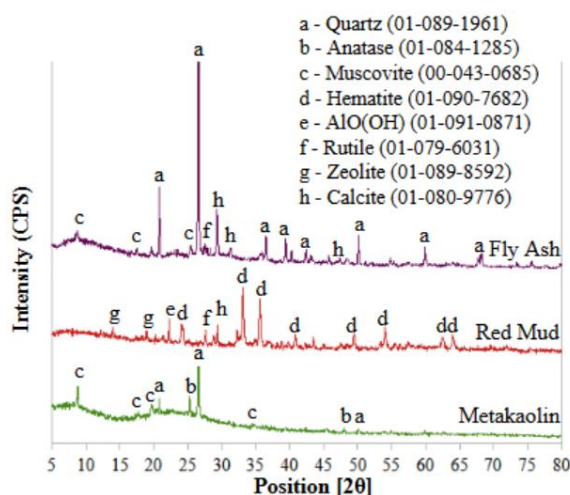


Figura 4. Resultados de DRX: FA, RM y MK

Composición de los productos

La preparación de los AAMs se llevó a cabo de la siguiente manera: la mezcla de 50 % en peso de RM y metacaolín se combinó con la solución activadora alcalina (preparada previamente mezclando 100 g de silicato de sodio (Chem-Lab, Bélgica) con una relación $\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O} = 3.09$, 14.16 g de hidróxido de sodio (Sigma Aldrich) y 13.39 g de agua). Tras añadir 0.12 % en peso de polietilenglicol (PEG-600, Alfa Aesar), la pasta, fue homogeneizada en un mezclador centrífugo planetario (ARE-250) a 800 rpm durante 6 min.

A continuación, en la Tabla 2, se muestran las diferentes concentraciones de los productos analizados

Tabla 2: Composición de cada producto analizado

Masa (g)						
Producto	MK	FA	RM	PEG	Agua	Activador
GMK	5	-	-	-	0.5	6.5
G2.27FA	3.07	2.27	3.87	0.12	0.5	6.5
G3.37FA	3.07	3.37	2.77	0.12	0.5	6.5

2.2. ENSAYO DE LIXIVACIÓN

El ensayo de lixiviación se ha aplicado a los materiales siguiendo la UNE-EN-12457-4 para conocer la concentración de elementos lixiviados de residuos granulares y lodos y explicar así su comportamiento. El ensayo es realizado durante 24 horas, a una relación líquido-sólido (L/S) de 10 L/kg de materia seca y a temperatura ambiente. Además, el material debe ser triturado y es necesario tamizarlo para obtener un tamaño de partícula menor a 10 mm, en este caso no fue necesario el tamizado ya que las muestras tenían ya como formato de envío con un tamaño mucho menor que 10 mm, se utilizan dos tipos de agentes lixiviantes, el agua desionizada y el agua de mar filtrada dependiendo del manejo posterior. Para cada materia prima y producto se realizan los pasos que se describen a continuación por triplicado para cada una de las réplicas. El procedimiento del ensayo se muestra de forma general en la Figura 5:

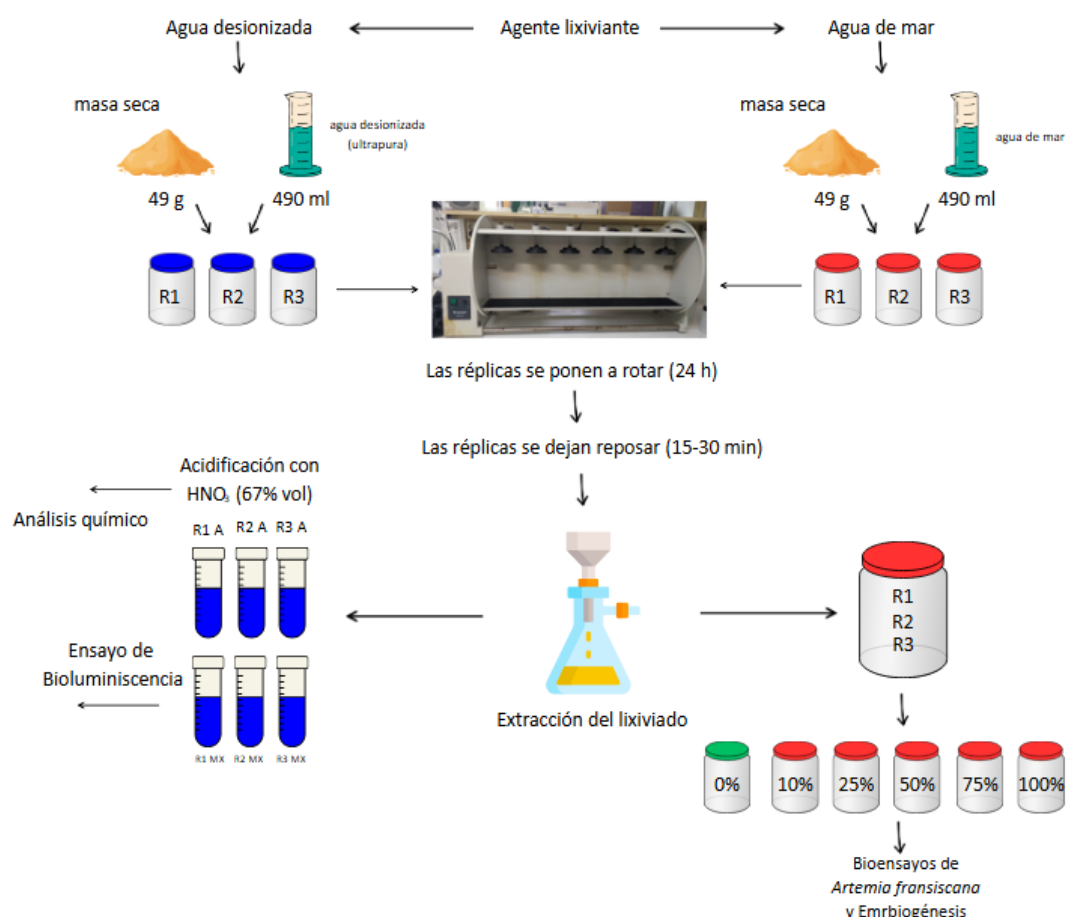


Figura 5: Diagrama general del ensayo de lixiviación.

2.2.1. Ensayo de lixiviación con agua desionizada.

1. Se toman 49 g de la masa seca a ensayar y se depositan en un bote duquesa de 500 ml previamente aclarado con HNO_3 (2% M) y agua desionizada.
2. Se añade una cantidad de agua desionizada que establezca un ratio L/S de 10 L/Kg en materia seca, es decir, 490 ml. El agua desionizada utilizada es la que suministra el equipo de purificación como se muestra en la Figura 6 a), obteniendo de esta agua tipo III, que luego pasa a un segundo módulo de purificación en la Figura 6 b), obteniendo finalmente el agua tipo I.



Figura 6: Equipo de purificación de agua. a) Módulo de agua tipo III b) Módulo de agua tipo I.

3. Ésta mezcla se agita en un equipo rotatorio, como el de la Figura 7, durante 24 h a 10 rpm a temperatura ambiente aproximada de 22°C. Al finalizar la rotación hay que asegurarse de que no queden restos de sedimento en la parte interior de la tapa; esto evita que se vuelvan a decantar y esto ensucie el agua en el momento de abrir la tapa para proceder a la extracción del lixiviado una vez transcurrido el periodo de reposo (15-30 minutos).



Figura 7. Rotador o agitador usando en el ensayo de lixiviación

4. Se filtra el lixiviado sobre filtros de membrana de 0,45 μm empleando el equipo de filtración de vacío de la Figura 8 (previamente limpiado con HNO_3 y posteriormente con agua desionizada).



Figura 8. Equipo de filtración usado en el ensayo de lixiviación

De los elementos que se obtienen para cada réplica de lixiviado uno es \$\$\$, para el posterior análisis químico ajustado en su pH (6.5-8.5) y para el otro se mide su conductividad y su pH para que posteriormente sea analizado en el test de reducción de la luminiscencia de *Vibrio fischeri*.

2.2.2. Ensayo de lixiviación con agua de mar filtrada.

El ensayo se basa en la misma norma que el ensayo de agua desionizada. Las etapas en las que consta el ensayo son las siguientes:

1. Se toman 49 g de la masa seca a ensayar y se depositan en un bote duquesa de 500 ml previamente aclarado con HNO_3 y agua desionizada.
2. Se añade una cantidad de agua de mar filtrada que establezca un ratio L/S de 10 L/Kg en materia seca, es decir, 490 ml. El agua de mar filtrada utilizada fue recolectada de la playa de la Maruca, la cual es filtrada a $0.22\ \mu\text{m}$ y sometida a un purificador de luz ultravioleta para eliminar la carga orgánica.
3. La mezcla se agita en el mismo rotador usado para el ensayo de lixiviación pasado, durante 24 h a $10\ \text{min}^{-1}$ a temperatura ambiente. Al finalizar la rotación hay que asegurarse de que no queden restos de sedimento en la parte interior de la tapa; esto evita que se vuelvan a decantar y esto ensucie el agua en el momento de abrir la tapa para proceder a la extracción del lixiviado una vez transcurrido el periodo de reposo (15-30 minutos).

4. Se filtra el lixiviado sobre filtros de membrana de 0,45 µm empleando el equipo de filtración de vacío usado en el ensayo de lixiviación pasado (previamente limpiado con HNO₃ y posteriormente con agua desionizada).
5. Se coloca el lixiviado de cada masa seca en una duquesa de 1 L, para posteriormente diluirlo, esto se explicará más adelante en la preparación de cada uno de los test en los que se emplea agua de mar filtrada.

El lixiviado obtenido posteriormente se utilizará para la realización de los tests de desarrollo larvario del erizo de mar *Paracentrotus lividus* y supervivencia de nauplii de *Artemia franciscana*.

2.2.3. Análisis químico

A los lixiviados destinados al análisis químico se les vierte 1 ml de ácido clorhídrico 35% con el objetivo de fijar los metales en la muestra y obtener un mejor resultado.

Estos son analizados por el departamento de Campus Torre de investigación de infraestructuras de la Universidad de Santiago de Compostela.

2.3. TEST ECOTOXICIDAD: REDUCCIÓN DE LA LUMINISCENCIA DE *VIBRIO FISCHERI*

El test con bacterias luminiscentes (*Vibrio fischeri*) se ha realizado de acuerdo con la norma internacional ISO 11348–3:2007 utilizando un analizador de toxicidad por bioluminiscencia modelo MICROTOX LX que se muestra en la Figura 9.



Figura 9 : Analizador de toxicidad modelo MICROTOX LX.

Este equipo es un fotómetro de alta sensibilidad que mide automáticamente la emisión de luz por parte del microorganismo bajo condiciones de ensayo y temperatura

controladas, utilizando el software Microtox LX, el cual consiste en modelar el parámetro de variación de luz (γ).

γ se determina mediante la correlación entre la luz emitida por las bacterias inicialmente y después de 15 y 30 minutos de contacto con las concentraciones correspondientes de lixiviado.

La respuesta de las bacterias se correlaciona con la concentración del lixiviado para desarrollar una ecuación lineal que predice la respuesta de emisión de luz en función del contacto con un lixiviado específico.

2.3.1. Obtención y activación de la bacteria

La bacteria *Vibrio fischeri* (cepa NRRL B-11177) fue suministrada en viales de 1 mL por Aqua Science en forma liofilizada y almacenada congelada a temperaturas entre -18°C y -20°C . Para activar las bacterias con fines de este ensayo, estas se reconstituyeron utilizando una solución comercial de cloruro de sodio, cloruro de magnesio hexahidratado y cloruro de potasio, que proporcionó condiciones adecuadas para facilitar que las bacterias emitieran la luz necesaria para la prueba.

2.3.2. Preparación del test

En el test realizado se aplicó la modalidad de prueba básica, conforme a la norma. Para ella se utilizaron cuatro diluciones de lixiviado de cada muestra y un blanco: 0, 5.6, 11.25, 22.5 y 45 %, antes de empezar con el procedimiento del test, se midió la conductividad y el pH de los lixiviados se ajustó entre 6.5 y 8.5 añadiendo diferentes cantidades de NaOH o HCl (0.1 N) y realizando un ajuste osmótico (con una solución de $20\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de NaCl).

2.3.3. Puesta en contacto

A los 15 y 30 minutos de poner en contacto las bacterias con las diluciones de lixiviado, se midió la luminiscencia emitida por las bacterias (para cada una de las tres replicas). La inhibición causada por el lixiviado se expresó como la concentración de lixiviado que produce una reducción en la luminiscencia en comparación con la intensidad lumínica de la muestra de control.

2.3.4. Análisis de resultados EC20, EC50.

A partir del modelado de estos resultados se obtuvieron las curvas dosis-respuesta. De estas curvas se determinaron tres parámetros: el valor EC20, que corresponde a la concentración de lixiviado que produjo una inhibición de luminiscencia del 20 %, el factor de dilución inefectivo más bajo (LID), que se define como la concentración que produce la más mínima disminución significativamente medible y reproducible de la emisión de luz bajo las condiciones experimentales y el EC50 que corresponde a la concentración del lixiviado que causa un 50% de inhibición de la luminiscencia en las bacterias. El criterio de toxicidad utilizado en este test de ecotoxicidad es un valor de LID superior a 8, según lo establecido en el marco legislativo alemán para el sector de la construcción (German Institute for Building Technology, 2017).

2.4. TEST ECOTOXICIDAD: SUPERVIVENCIA DE NAUPLII DE ARTEMIA FRANCISCANA

El procedimiento experimental seguido en este Trabajo Fin de Grado está basado en (Varó et al., 2019) con algunas modificaciones y se resume de manera genera en la Figura 10:

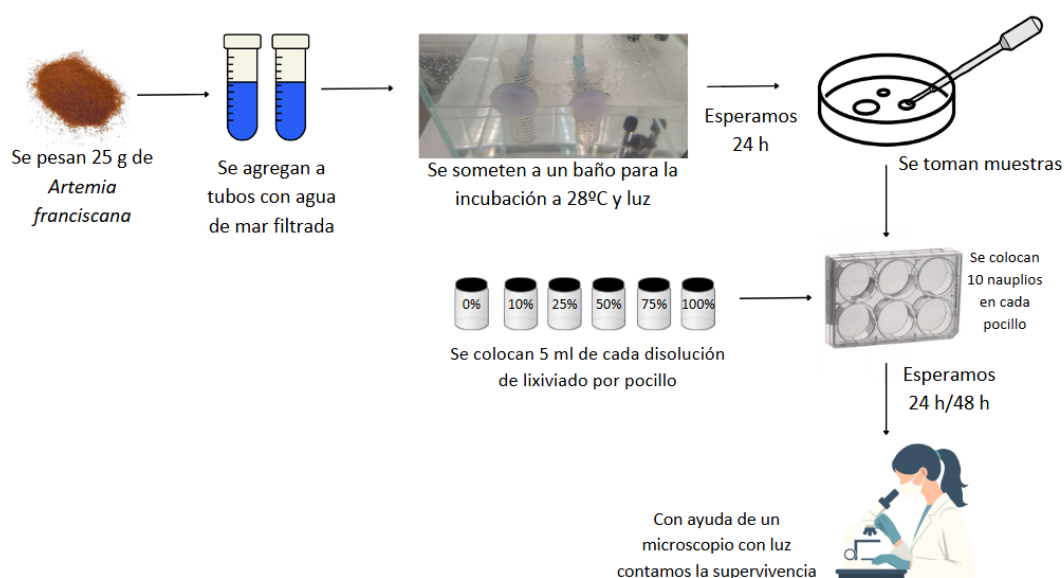


Figura 10: Diagrama general del test supervivencia de nauplii de *Artemia franciscana*.

2.4.1. Preparación del test

Se toma agua de mar natural, se filtra con un filtro de celulosa de 0,22 micras y se almacena en nevera en completa oscuridad

Se preparan los tal como se describe en el apartado 2.2. Las muestras se conservan en nevera, aunque si el test no se va a realizar en los próximos días, se puede congelar la muestra.

Se filtra agua de mar y se conserva a 25°C. Se pesan los huevos de Artemia, aproximadamente 0,25 gramos. Los huevos de *Artemia franciscana* se almacenan a 5°C en frigorífico.

Para la incubación de los huevos se les coloca en un frasco cónico con el agua de mar previamente filtrada como se muestra en la Figura 11, con una gran aireación, en un baño a una temperatura de 25°C y con luz.



Figura 11: Incubación de huevos en baño de agua de mar.

2.4.2. Eclosión de los huevos de artemia franciscana.

Los huevos eclosionan antes de las 24 horas de haber comenzado la incubación. Para poder apreciarlo es necesario apagar la aireación y poner una luz en la parte posterior del recipiente cónico. Los restos de los huevos quedarán suspendidos y en la parte inferior podrán verse los nauplii en sus primeras fases de desarrollo que se muestran en la Figura 12. El test se realizará con los nauplii que estén en las fases Instar II y III, por lo

que debe realizarse aproximadamente a las 24 horas de haber comenzado la incubación como se muestra en la Figura 13.

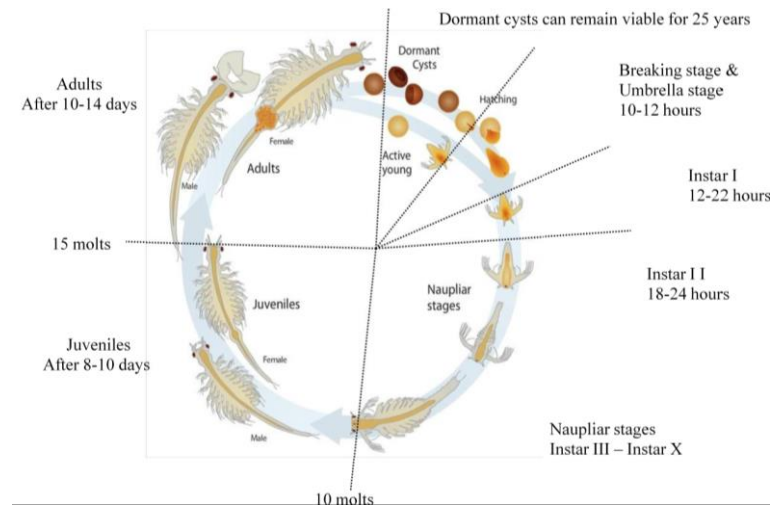


Figura 12. Ciclo de vida de *Artemia* y duración de sus etapas de desarrollo.

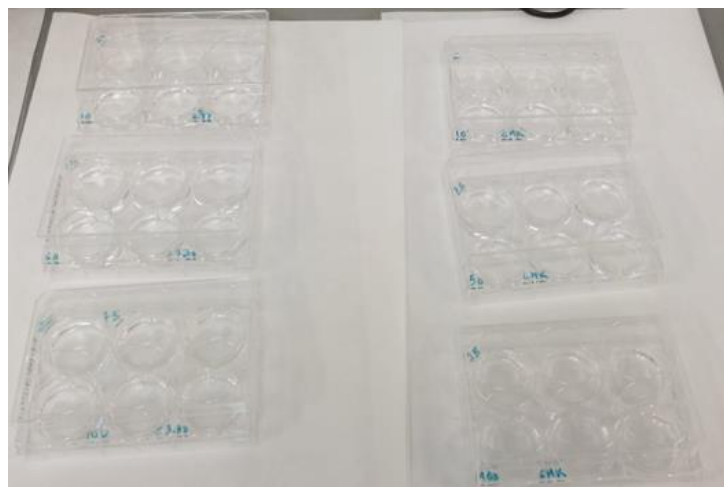


Figura 13: Nauplii en fase instar II y III.

2.4.3. Parámetros controlables y medidos

Los parámetros fundamentales que hay que controlar para que el test sea reproducible son la temperatura, los ciclos de luz, la aireación, salinidad y el tamaño de las larvas.

Una vez puesta la incubación se miden los parámetros del lixiviado y del agua de mar, como la salinidad y pH de las muestras y se ajusta en caso de que sea necesario el pH con HCl 0,1N.

2.4.4. Preparación de las diluciones de lixiviado

Con las muestras con el pH ajustado se realizan las diluciones del lixiviado. Se prepararán muestras de 5 ml con las diluciones del 100%, 75% (3.75 ml lixiviado, 1.25 de agua de mar), 50% (2.5 mL lixiviado, 2.5 mL agua de mar), 25% (1.25 mL lixiviado, 3.75 mL agua de mar), así como un control (0% lixiviado) y se le vuelve a medir el pH.

Se realiza además el test con un tóxico de referencia, el C_6H_6O (fenol). Se prepara una disolución de 100 ppm y con ella las diluciones correspondientes del 100%, 50%, 25% y 10%. El fenol se debe manejar en campana debido a su toxicidad.

2.4.5. Puesta en contacto

Aproximadamente a las 24 horas de haber puesto los huevos de *Artemia franciscana* a incubar se comienza con el test. Se va a realizar en placas multipocillo (con 6 pocillos), con 3 replicados por muestra. Se toma una muestra del cultivo de artemias y se van añadiendo pequeñas gotas sobre una placa Petri. Con una pipeta de cristal y bajo la lupa se van cogiendo y contando nauplii. Se deposita en cada pocillo 10 nauplii intentando recoger la menor cantidad de agua posible para que no se produzca dilución de las muestras. Se comprueba que la movilidad de los nauplii seleccionados sea buena. Una vez se tienen los nauplii en las placas se añaden 5 mL de la dilución correspondiente, previamente aireadas. Se comienza con el agua de control y después con las muestras desde la más diluida a la más concentrada para evitar contaminación.

Las placas se dejan reposar con la tapa un poco abierta para que entre el oxígeno necesario durante 24h.

A las 24 horas, se van a contar el número de nauplii que han muerto, los vivos y se anota toda la información relevante sobre su movilidad, tamaño, color, etc. En una lupa como la que se muestra en la Figura 14.

Este paso se repite también a las 48 horas.



Figura 14: Lupa y vista de la *Artemia franciscana* a través del lente.

2.5. TEST ECOTOXICIDAD: DESARROLLO LARVARIO DEL ERIZO DE MAR *PARACENTROTUS LIVIDUS*

2.5.1. Preparación del test

El test de desarrollo larvario del erizo de mar *Paracentrotus lividus* se realizó siguiendo el procedimiento descrito en la Figura 15.

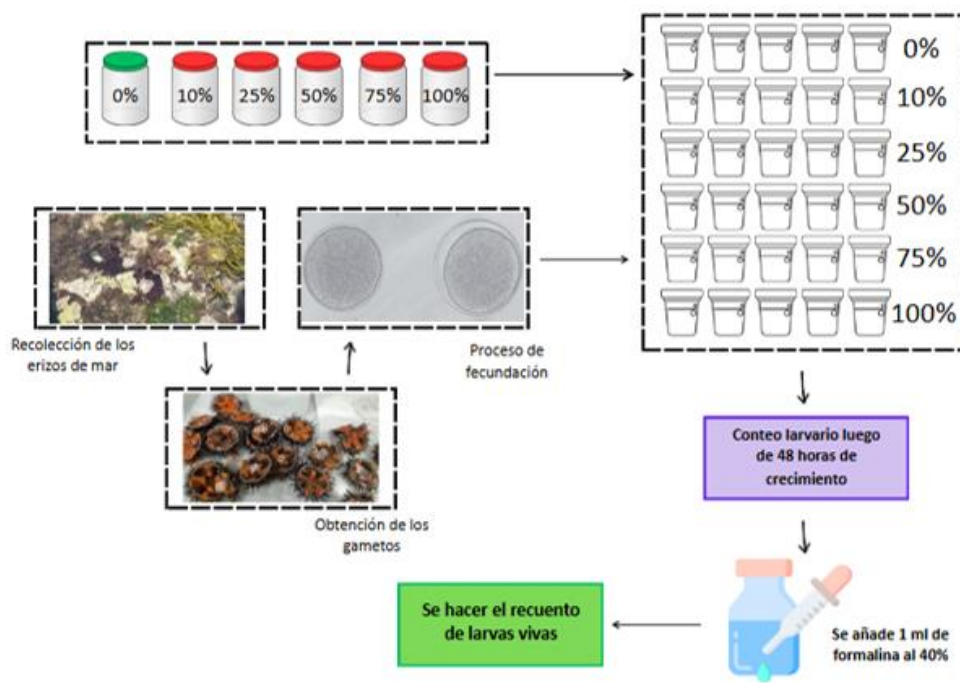


Figura 15: Diagrama general del test de desarrollo larvario *Paracentrotus lividus*

Al igual que en los otros test de ecotoxicidad, el pH de los lixiviados obtenidos con agua de mar se ajustó a valores entre 6.5 y 8.5, añadiendo NaOH o HCl (0.1 N), esto se hace

para cumplir con las condiciones adecuadas del pH del agua de mar (7-8.5) según la norma CEN/TR 17105:2017.

Se prepararon cinco diluciones de cada muestra de lixiviado y una muestra control solo con agua de mar: 0 % o Control(CC), 10 %, 25 %, 50 %, 75 % y 100 %.

Los erizos de mar de la especie *Paracentrotus lividus* fueron recolectados manualmente en marea baja en una zona costera rocosa intermareal limpia, llamada “La Maruca”, que está situada cerca de Santander (noroeste de España), y transportados en una nevera portátil al laboratorio. Una vez en el laboratorio, se obtuvieron los gametos mediante disección de organismos maduros (tres machos y tres hembras al menos) y se comprobó su madurez (movilidad de los espermatozoides y esfericidad de los óvulos) con un microscopio.

2.5.2. Procedimiento de fertilización

Antes de empezar con el test de desarrollo larvario del erizo de mar *Paracentrotus lividus*, se lleva a cabo un procedimiento de fertilización según (Volpi Ghirardini et al., 2005).

Este proceso se puede resumir en los siguientes puntos:

- i. Los óvulos se transfirieron a una probeta graduada de 100 mL que contenía agua de mar limpia y filtrada
- ii. Se añadieron aproximadamente 10 μ L de esperma.
- iii. La mezcla se agitó suavemente para facilitar la fertilización.
- iv. Se tomaron alícuotas de 20 μ L y se contó el número total de óvulos y de óvulos fecundados en una cámara de recuento Neubauer bajo microscopio invertido (Motic AE 2000).
- v. El éxito de la fertilización que definimos aquí como aquellos óvulos completamente rodeados por una membrana de fecundación fue aproximadamente del 92%.

2.5.3. Puesta en contacto

El test de desarrollo larvario del erizo de mar *Paracentrotus lividus* se realizó de acuerdo con el procedimiento descrito por (Garmendia et al., 2009)

Se llenó cada frasco de 20 ml con la dilución seleccionada (5 réplicas por dilución de cada lixiviado) y se colocaron aproximadamente 500 huevos fertilizados en cada uno de ellos. Bajo condiciones de oscuridad y a 20 °C como se muestra en la Figura 16.



Figura 16: Frascos con la dilución seleccionada con 500 huevos aproximadamente.

Estos huevos fertilizados se incubaron durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, las muestras se fijaron con 1 mL de formalina al 40 %. Con un microscopio invertido se registró la cantidad de larvas desarrolladas según los diferentes niveles de desarrollo por cada 100 organismos en cada réplica (Khosrovyan et al., 2013) Para validar la aceptabilidad de la prueba, en la muestra control al menos el 90 % de las larvas deben alcanzar el Nivel 0 de desarrollo.

En este estudio se establecieron 4 niveles de toxicidad, que se muestran en la Figura 17:

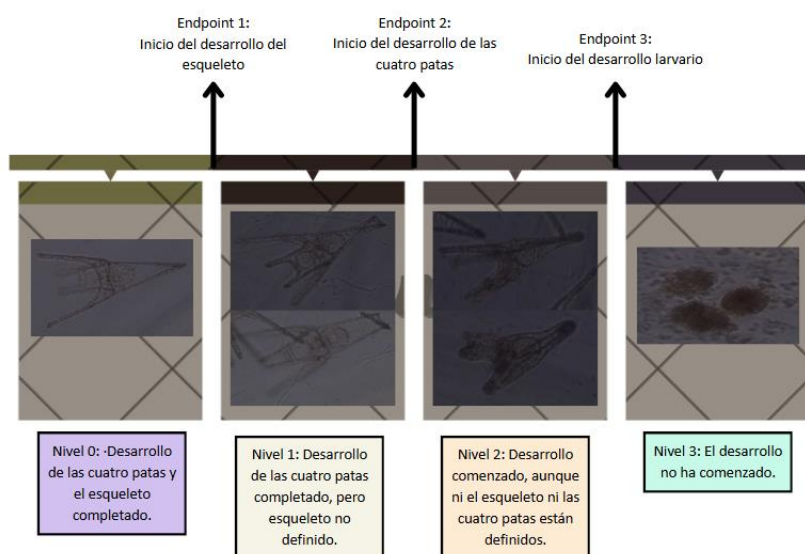


Figura 17: Clasificación propuesta de los niveles de toxicidad en larvas de erizo de mar para la evaluación de los materiales analizados.

2.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de las pruebas ecotoxicológicas y el análisis de elementos traza en los lixiviados se expresaron como medias $\pm$ desviaciones estándar y se calcularon utilizando Microsoft Office Excel para Microsoft 365 MSO.

Los datos obtenidos en el test supervivencia de nauplii de *Artemia franciscana* se verificaron en cuanto a la homogeneidad y normalidad de las varianzas de los datos y se comprobaron mediante las pruebas de Levene y Kolmogorov-Smirnov, respectivamente. La supervivencia de los nauplii tras 24 y 48 horas de exposición a diferentes concentraciones de lixiviado de materias primas y productos se ajustó mediante un análisis de regresión no lineal utilizando MOSAIC (Charles et al., 2018). MOSAIC (Modelización y Herramientas Estadísticas para la Ecotoxicología) es una calculadora en línea para ecotoxicólogos. Todos los cálculos de MOSAIC se basan en el paquete complementario de R morse (Baudrot & Charles, 2021).

Se utilizaron dos parámetros como expresión de los resultados de los bioensayos:

- (i) Los valores de los parámetros EC20 y EC50, calculados desde las curvas dosis-respuesta, se definen como aquellas concentraciones de lixiviado que causan un 20% y un 50%, respectivamente, de inhibición de la luminiscencia en las bacterias, o que induce efectos sobre el 20% o 50% en el normal desarrollo de las larvas de erizo de mar.
- (ii) El valor LID (Lower Ineffective Dilution), que corresponde a la dilución inefectiva más baja, es decir, la concentración más alta del lixiviado que no causa un efecto significativo o que solo produce efectos que no superan la variabilidad específica de la prueba.

Los datos recopilados del test reducción de la luminiscencia de *Vibrio fischeri* se obtuvieron a través del software del equipo y se representaron en Excel, en base al parámetro de variación de luz emitida por las bacterias Γ . El criterio de toxicidad utilizado este ensayo corresponde a un valor del parámetro LID superior a 8, según lo establecido en el marco legislativo alemán para el sector de la construcción (German

Institute for Building Technology, 2017). El parámetro LID fue determinado de acuerdo con la EQ1 (Gartiser et al., 2017).

$$LID = \frac{1}{EC20} (100) \quad (EQ1)$$

Los datos obtenidos del test de desarrollo larvario del erizo de mar *Paracentrotus lividus* se verificaron en cuanto a normalidad y homogeneidad mediante las pruebas de Shapiro–Wilk y Levene, respectivamente, con el software para tratamiento estadístico PSPP. Se realizó un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con la prueba Post Hoc HSD de Tukey para determinar las diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) en el desarrollo larvario entre los diferentes lixiviados obtenidos de los productos y con respecto al tratamiento control. Cuando no se cumplieron los supuestos de normalidad y homogeneidad necesarios para el ANOVA, los datos se transformaron de acuerdo con la escalera de transformaciones de Tukey.

La modelización de la curva dosis-respuesta del test de desarrollo larvario del erizo de mar *Paracentrotus lividus* fue obtenida mediante un análisis de regresión no lineal utilizando MOSAIC, al igual que en el test de *Artemia franciscana*.

3. RESULTADOS

3.1. LIXIVIACIÓN DE ELEMENTOS TRAZA

En este apartado se muestran los resultados del análisis químico de los lixiviados obtenidos de materias primas y productos como se muestra en la Tabla 3 de acuerdo con el ensayo de lixiviación UNE EN-12457-4, descrito anteriormente. En este ensayo, además de agua desionizada se realizó una adaptación a la norma con agua de mar, ambas actuando como agentes lixiviantes.

Los valores de pH obtenidos en los lixiviados de las materias primas (8.59-11.72) se encuentran dentro del rango habitual para este tipo de materiales (9-13). El pH de los lixiviados de los AAMs derivados de estos residuos (10.87-11.70), están dentro del rango habitual de los materiales activados alcalinamente (11-13). Por otro lado, la conductividad, que aporta información sobre el contenido iónico del lixiviado, presenta sus valores más bajos en las materias primas, siendo el RM el que tiene la conductividad

más baja (0.6-0.7 mS/cm), en cuanto a los productos, presentan valores más altos los AAMs formados por RM y FA (3.69-4.21 mS/cm) que el que está formado solo por MK (2.11-2.3 mS/cm), los productos tienen valores más altos debido al proceso de activación alcalina.

En relación con el comportamiento de lixiviación de las materias primas, podemos ver que el RM que sobrepasa el límite para residuos inertes para los elementos: Cr, Hg, Mo, Se y V y sobrepasa el límite para residuos no peligrosos para el elemento As. Podemos ver que el FA, sobrepasa el límite para residuos inertes para los elementos: Cr, Mo y Sb y sobrepasa el límite para residuos no peligrosos con el elemento Se. También podemos ver que el MK no sobrepasa el límite para residuos inertes para ningún elemento traza analizado.

Para el caso del comportamiento de lixiviación de los productos, primero tenemos al GMK que sobrepasa el límite para de residuos inertes para los elementos As y V, además, sobrepasa el límite para residuos no peligrosos con el elemento Se. El segundo producto, G2.27FA sobrepasa el límite para residuos inertes para los elementos: Cr, Hg, Mo, Se y V, también sobrepasa el límite para residuos no peligrosos con el elemento As. Por último, el producto G3.37FA que sobrepasa el límite para residuos inertes con los elementos: Cr, Hg, Mo y sobrepasa el límite para residuos no peligrosos con los elementos: As, Se y V.

Con respecto a las concentraciones de aniones, para el caso de las materias primas, solo superan los límites de residuos inertes el FA (SO_4^{2-} y Cl) y RM, sin superar los residuos no peligrosos

En cualquier caso, los criterios de aceptación de residuos en vertederos son utilizados como referencia, a modo de guía, no constituyen un marco completo ni ajustado para el caso de los AAMs.

Tabla 3: Concentración de contaminantes en los lixiviados (EN 12457-4) de las materias primas (MK, FA, RM) y productos (GMK, G2.27FA, G3.37FA).

Materias Primas				Límites de vertido*		
mg/kg	MK	FA	RM	I	NP	P
As	0.039±0.013	0.412 ± 0.003	2.586±0.528	0.5	2	25
Ba	1.359±0.633	6.39 ± 0.057	0.008±0.004	20	100	300
Cd	0.001	<0.001	<0.001	0.04	1	5
Cr	0.014±0.005	1.045 ± 0.007	0.554±0.119	0.5	10	70
Cu	0.003±0	0.001 ± 0.001	0.039±0.009	2	50	100
Hg	<0.001	<0.001	0.015±0.004	0.01	0.2	2
Mn	0.076±0.022	<0.001	0.01±0.003	-	-	-
Mo	0.007±0.002	5.085 ± 0.021	0.781±0.186	0.5	10	30
Ni	0.011±0.003	0.002 ± 0.001	0.009±0.004	0.4	10	40
Pb	0.007±0.006	<0.001	0.001	0.5	10	50
Sb	0.007±0.001	0.094 ± 0.005	0.008±0.002	0.06	0.7	5
Se	0.076±0.016	0.817 ± 0.019	0.152±0.023	0.1	0.5	7
Zn	0.082±0.02	<0.001	0.031±0.012	4	50	200
V	0.294±0.111	0.766 ± 0.002	26.018±5.442	1.5	-	-
F ⁻	0.485±0.021	7.995±0.134	86.745±0.559	10	150	500
SO ₄ ⁻²	71.22±4.073	7145.015±62.657	434.465±5.127	1000	20000	50000
Cl ⁻	4.57±261.453	3287.015±129.634	29.685±0.799	800	15000	25000
pH	8.59	11.72	11			
Cond. (mS/cm)	1.05	1.764	0.65			
Productos				Límites de vertido*		
mg/kg	GMK	G2.27FA	G3.37FA	I	NP	P
As	1.679±0.108	10.156±0.729	10.549±3.098	0.5	2	25
Ba	0.101±0.074	0.027±0.018	0.023±0.004	20	100	300
Cd	<0.002±0.001	<0.005±0.001	<0.003±0.001	0.04	1	5
Cr	0.47±0.019	0.482±0.039	0.755±0.221	0.5	10	70
Cu	0.031±0.003	0.07±0.003	0.06±0.018	2	50	100
Hg	0.002±0.001	0.078±0.008	0.061±0.018	0.01	0.2	2
Mn	0.017±0.005	0.052±0.002	0.053±0.015	-	-	-
Mo	0.167±0.024	0.654±0.043	0.76±0.246	0.5	10	30
Ni	0.029±0.004	0.024±0.002	0.012±0.005	0.4	10	40
Pb	0.068±0.044	0.005±0.001	0.003±0.001	0.5	10	50
Sb	0.005±0.004	0.013±0.001	0.012±0.007	0.06	0.7	5
Se	0.549±0.037	0.445±0.031	0.554±0.16	0.1	0.5	7
Zn	0.046±0.024	0.02±0.004	0.015±0.004	4	50	200
V	16.794±1.149	30.357±2.225	30.826±9.13	1.5	-	-
F ⁻	38.905±1.082	35.91±1.683	36.24±0.976	10	150	500
SO ₄ ⁻²	173.44±2.503	1816.555±73.263	2740.745±61.737	1000	20000	50000
Cl ⁻	63.395±0.615	603.295±17.996	915.56±22.359	800	15000	25000
pH	10.87	11.46	11.70			
Cond.(mS/cm)	2.21	3.73	4.10			

*Límites según los Criterios de Aceptación de Residuos en Vertederos (Landfill Waste Acceptance

Criteria, 2003/33/CE); I: inerte; NP: no peligroso; P: peligroso

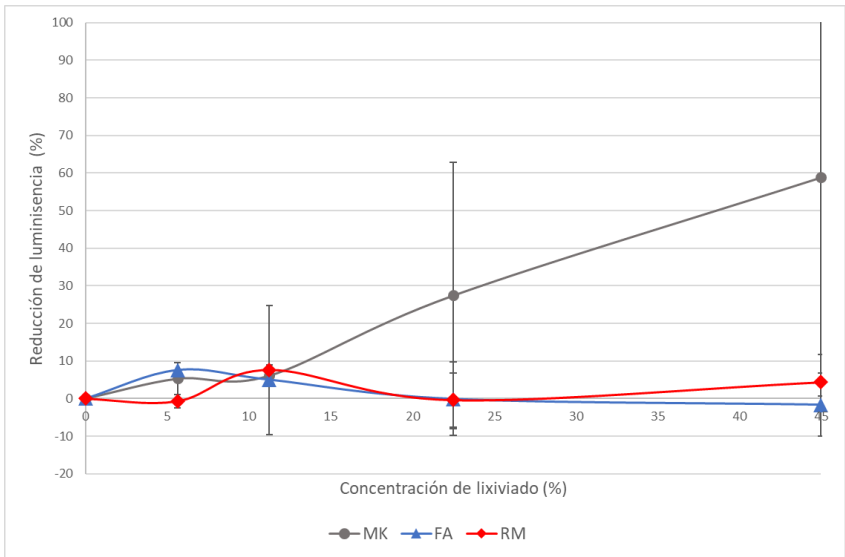
Como se observa, el G2.27FA y G3.37FA muestran una mayor movilidad de As que el GMK, además, más elementos superan el límite de residuos inertes para estos dos productos. En general podemos destacar que el G3.37FA moviliza un mayor número de elementos en concentraciones mayores que el G2.27FA y el GMK.

3.2. REDUCCIÓN DE LA LUMINISCENCIA DE *VIBRIO FISCHERI*

Los resultados del test, expresados como porcentaje de reducción de la emisión de luz de *Vibrio fischeri* después de 15 minutos de exposición en función de la concentración de lixiviado de las materias primas y productos, se muestran en las Figuras 18 y después de 30 minutos de exposición en la Figura 19. Además, como se muestra en la Tabla 4 que contiene los resultados de EC20, LID y EC50 para 15 minutos y la Tabla 5 para 30 de cada materia prima y producto expresado como concentración de lixiviado, el LID es calculado de acuerdo con la EQ1.

Tabla 4: Resultados de EC20, LID y EC50 para materias primas (MK, FA, RM) y productos (GMK, G2.27FA, G3.37FA) a los 15 min de exposición.

	MK	FA	RM	GMK	G2.27FA	G3.37FA
EC20	18.4	-	-	22.5	-	-
LID	5.43	-	-	4.44	-	-
EC50	37.5	-	-	-	-	-



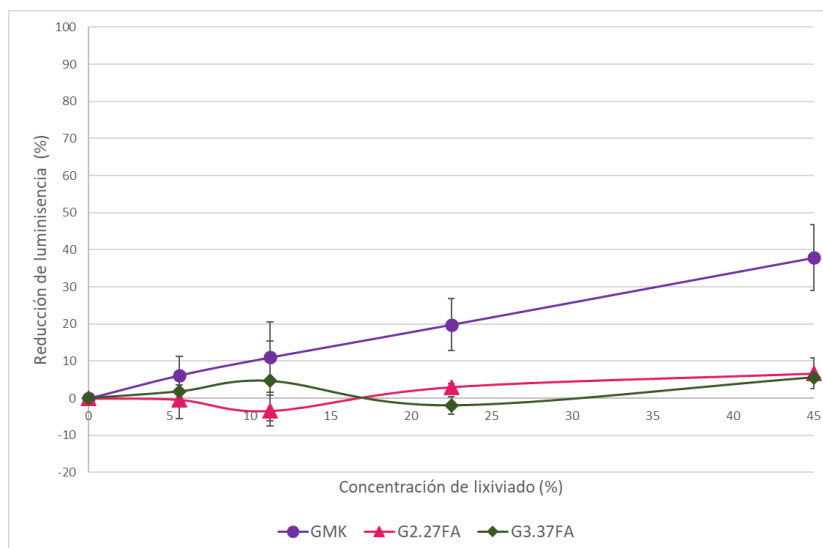
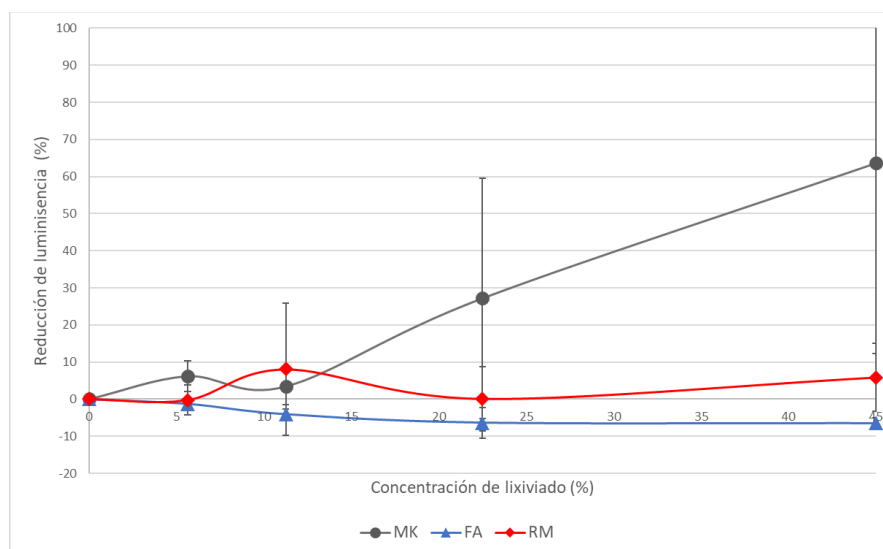


Figura 18: Resultados del test reducción de la emisión de luz de *Vibrio fischeri* de materias primas(MK, FA, RM) y productos(GMK, G2.27FA, G3.37FA), expresados como porcentaje de reducción de la emisión de luz de *Vibrio fischeri* después de 15 minutos de exposición, en función de la concentración de lixiviado con su correspondiente desviación.

Tabla 5: Resultados de EC20. LID y EC50 para materias primas (MK, FA, RM) y productos (GMK, G2.27FA, G3.37FA) a los 30 min de exposición.

	MK	FA	RM	GMK	G2.27FA	G3.37FA
EC20	19	-	-	19.2	-	-
LID	5.26	-	-	5.21	-	-
EC50	36.4	-	-	-	-	-



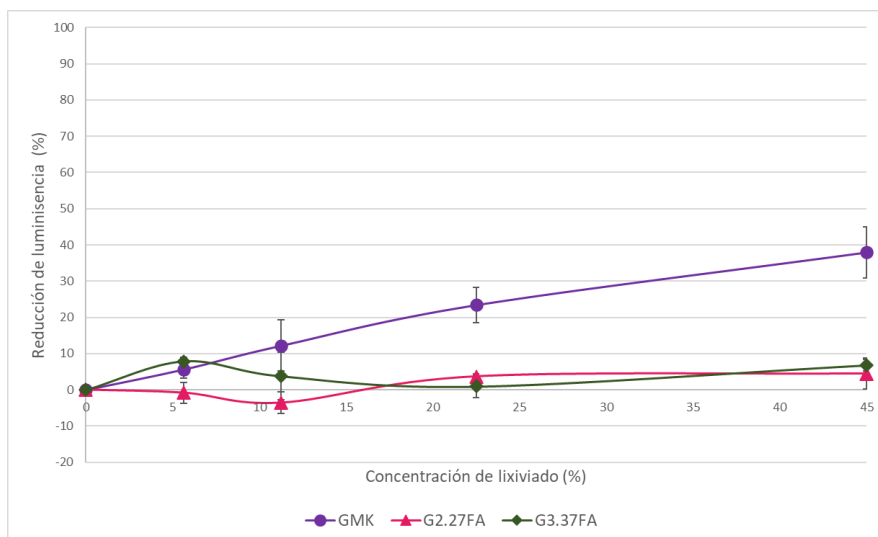


Figura 19: Resultados del test reducción de la emisión de luz de *Vibrio fischeri* de materias primas(MK, FA, RM) y productos(GMK, G2.27FA, G3.37FA), expresados como porcentaje de reducción de la emisión de luz de *Vibrio fischeri* después de 30 minutos de exposición, en función de la concentración de lixiviado con su correspondiente desviación.

Los resultados muestran que hay reproducibilidad entre ambos periodos de tiempo, siendo posible estimar que no habrá cambios significativos en periodos más prolongados.

La materia prima que produce la mayor reducción sobre la emisión de luz de la bacteria es el MK, que causa una reducción del 50% bajo una concentración de 36.4% de lixiviado a los 30 minutos de exposición.

En cuanto a la inhibición de la luminiscencia de los AAMs o productos, el AAM que produjo la mayor inhibición en la luminiscencia es el GMK, con una reducción del 20% bajo una concentración del 19.2% a los 30 minutos de exposición. En las siguientes dos muestras G2.27FA y G3.37FA podemos observar dos fenómenos, el primero que no provoca ningún efecto en las bacterias y el segundo que da lugar a que ocurra la hormesis, que es un fenómeno biológico en donde la sustancia tiene efectos estimulantes en la emisión de luminiscencia de la bacteria para bajas concentraciones de lixiviado.

Para las materias primas, en orden descendente según los valores de EC50, la afectación en la reducción de la luminiscencia fue la siguiente: MK $\gg$ (RM $\cong$ FA). En el caso de los productos, fue la siguiente: GMK $\gg$ (G2.27FA $\cong$ G3.37FA).

En el caso de las materias primas, el red mud fue el material que mostró mayor lixiviación de metales y metaloides y, sin embargo, no presentó un efecto significativo en la luminiscencia de las bacterias. En cambio, el metacaolín, que presenta menores concentraciones de metales y metaloides en el lixiviado, mostró un fuerte efecto reductor de luz en las bacterias.

Con respecto a los productos, mientras el análisis de metales mostró fuertes concentraciones de As en los AAMs, no reflejó un efecto significativo en la luminiscencia de las bacterias. Estos resultados coinciden con el trabajo de (Ishaque et al., 2006), quien concluye que, tras estudiar la toxicidad de varios metales, el arsénico es el que presenta el menor efecto en la luminiscencia bacteriana. Es de destacar que estos estudios son realizados a muestras sintéticas de metales aislados, sin embargo, en este trabajo se realiza a lixiviados basados en muestras complejas, por lo que podría haber interacciones basadas en efectos sinérgicos o antagónicos entre los elementos del lixiviado los resultados podrían diferir.

3.3. SUPERVIVENCIA DE NAUPLII DE *ARTEMIA FRANCISCANA*

Las *Artemias franciscanas* fueron expuestas a diferentes concentraciones de lixiviado de cada muestra para evaluar sus posibles efectos sobre la supervivencia de nauplii. Los resultados se muestran en las Figura 20 de manera general como un porcentaje de la población de artemias que sobrevivieron al lixiviado.

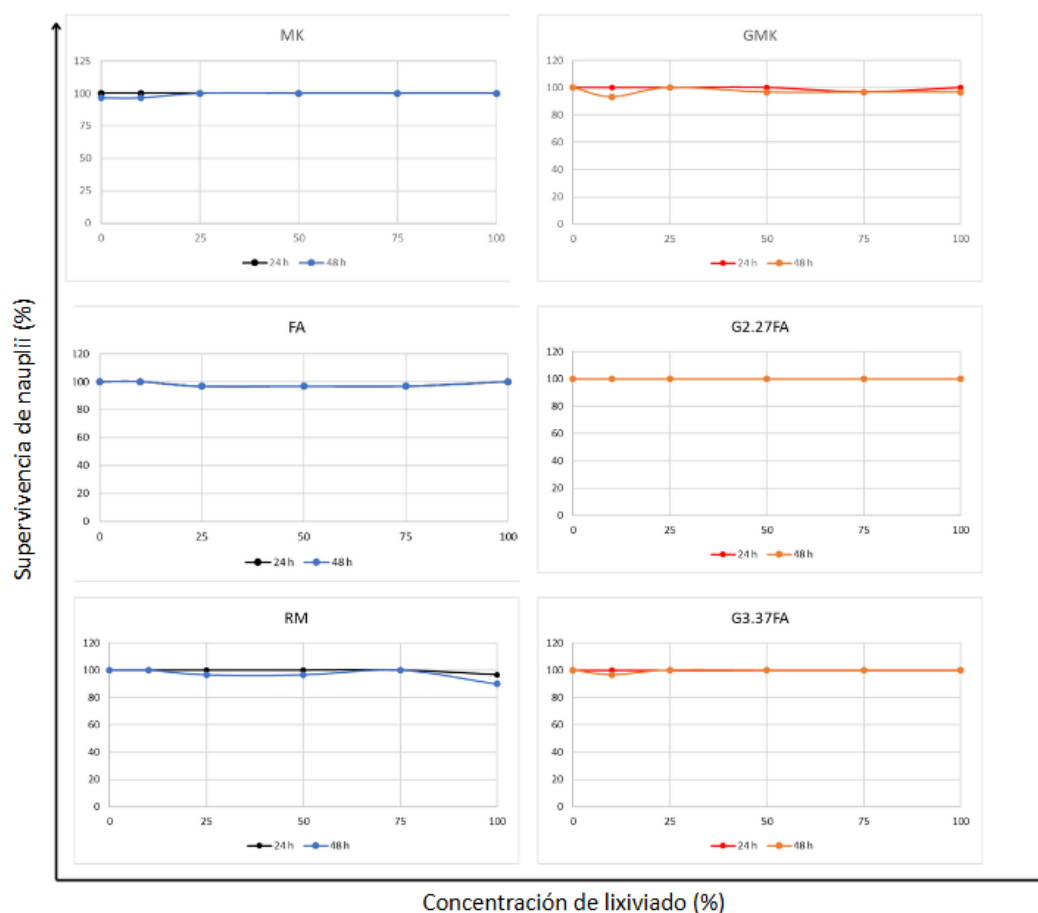


Figura 20: Curvas dosis-respuesta que muestran la supervivencia de nauplii durante 24 y 48 h a las diferentes concentraciones de lixiviado de materias primas (MK, FA, RM) y productos (GMK, G2.27FA, G3.37FA)

El control dio resultados de más del 90% de supervivencia, esto valida el experimento. Para evaluar la aceptabilidad del ensayo se ha usado fenol como tóxico de referencia, el cual muestra un comportamiento significativo (movimientos más lentos, menor índice de supervivencia en concentraciones altas, movimientos irregulares, concentración de la especie en un mismo lugar).

Los resultados mostraron que el efecto sobre la artemia no fue significativo tanto en las materias primas como en los productos ya que se encuentran por debajo del criterio de toxicidad con una supervivencia casi completa, es decir, una supervivencia de más del 90% según (Peixoto et al., 2022).

Los resultados obtenidos de supervivencia están en concordancia con otros resultados de la misma etapa estudiada en diferentes especies de artemia, tras exposiciones de corta duración a distintos tamaños y concentraciones de microplásticos. Asimismo, se

ha confirmado la acumulación de micropartículas en el interior del tracto digestivo. En la literatura (Gambardella et al., 2017) informaron que la supervivencia de nauplii de *Artemia franciscana* no se vio afectada tras una exposición de 24 horas a microesferas de poliestireno de 0,1 μm , a ninguna de las concentraciones evaluadas (de 0,001 a 10 mg L^{-1}). De manera similar, se informa que también encontraron que la supervivencia, el crecimiento y el desarrollo de nauplii de *Artemia franciscana* no se vieron afectados, después de 2 días de exposición, a concentraciones más altas (100 mg L^{-1}) de partículas de poliestireno de 5 μm (Suman et al., 2020).

Por otro lado, se han buscado más tóxicos de referencia para una posible puesta en marcha del test de supervivencia de nauplii de *Artemia franciscana* en un futuro, como el Cloruro de cadmio ($\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Nováková et al., n.d.) y Lauril sulfato de sodio (SDS) que es un tensioactivo aniónico muy usado en productos de limpieza o cosméticos según la literatura (Manfra et al., 2016).

3.4. DESARROLLO LARVARIO DEL ERIZO DE MAR *PARACENTROTUS LIVIDUS*

Los resultados se muestran en las Figuras 21, 22 y 23 en formato de diagrama de barras como resultado de las medias realizadas a las distintas réplicas para cada concentración de lixiviado. Los controles replicados muestran porcentaje superior al 90% de larvas que completan su desarrollo, validando el experimento.

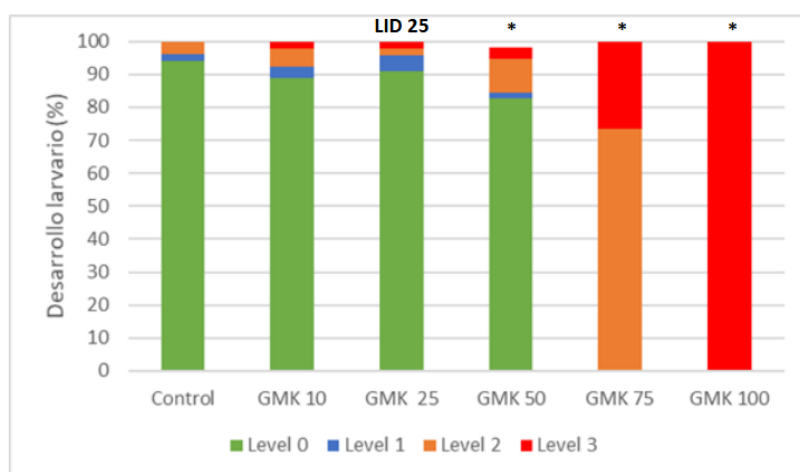


Figura 21: Resultados del test para el producto GMK de acuerdo con la clasificación de endpoints propuesta. Los asteriscos se refieren a diferencias significativas en el porcentaje de población en el nivel 0 de toxicidad respecto al control ($p < 0,05^*$).

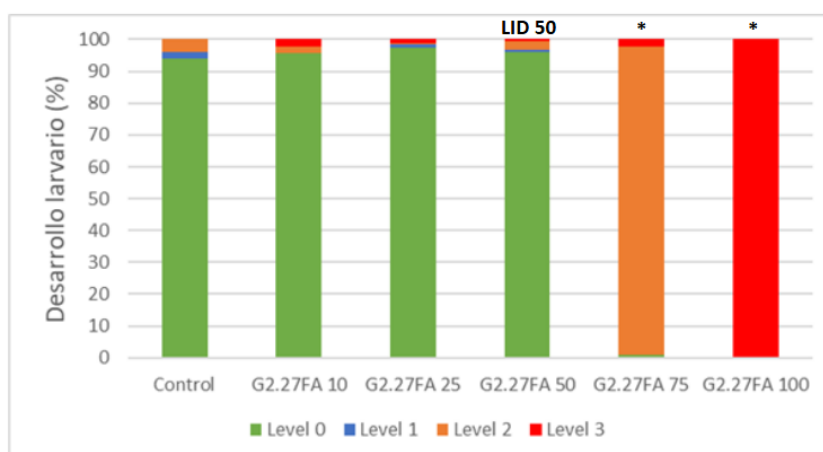


Figura 22: Resultados del test para el producto G2.27FA de acuerdo con la clasificación de endpoints propuesta. Los asteriscos se refieren a diferencias significativas en el porcentaje de población en el nivel 0 de toxicidad respecto al control ($p < 0,05^*$).

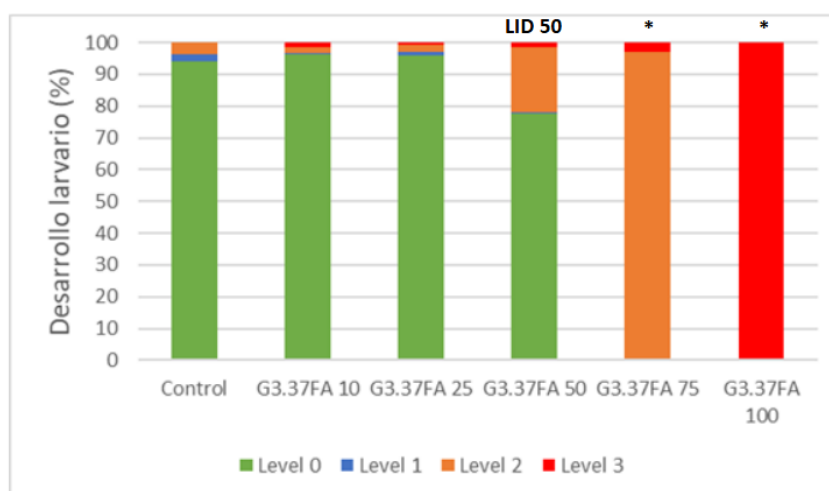


Figura 23: Resultados del test para el producto G3.37FA de acuerdo con la clasificación de endpoints propuesta. Los asteriscos se refieren a diferencias significativas en el porcentaje de población en el nivel 0 de toxicidad respecto al control ($p < 0,05^*$).

El análisis estadístico muestra diferencias significativas con respecto al control a partir de concentraciones del 50% en los productos G2.27FA y G3.37FA, mientras que en el GMK sucede a partir de concentraciones del 25%. A partir de este análisis estadístico, se definen los valores LID, que son las concentraciones más altas de lixiviado en las que no se observa un efecto significativo sobre el desarrollo normal de las larvas.

Los resultados mostraron que el lixiviado del producto GMK tiende a afectar el desarrollo larvario a concentraciones más bajas que los productos G2.27FA y G3.37FA.

Es importante destacar que en el caso de los productos GMK y G3.37FA hasta el nivel 2 las larvas presentan cuatro patas, pero no un desarrollo normal, si no, con deformidades para concentraciones elevadas de lixiviado, en cambio con el producto G2.27FA se ven larvas bien desarrolladas sin apenas deformaciones. Este tipo de efectos (es decir, ausencia de esqueleto, desarrollo incompleto de las cuatro patas) han sido previamente reportados en la literatura como consecuencia de la presencia de níquel ($100\text{ }\mu\text{g/l}$), plomo ($500\text{ }\mu\text{g/l}$), zinc ($14\text{--}58\text{ }\mu\text{g/l}$) o cobre ($128\text{ }\mu\text{g/l}$) en agua de mar (Fichet & Miramand, 1998; Fernández & Beiras, 2001; Kobayashi & Okamura, 2004); Camacho et al., 2018), o de diferentes concentraciones de vanadio (Chiarelli et al., 2021) o herbicidas a base de glifosato ($100\text{ }\mu\text{g/l}$) (Asnicar et al., 2020) o asociadas a la presencia de altas concentraciones de Ni en muestras sintéticas (Bonaventura et al., 2018).

Por otro lado, en el modelado de las curvas dosis–respuesta mostrado en la Figura 24 se puede observar que las curvas de resultados de cada uno de los productos son bastante similares entre sí. Además, podemos destacar que cuando las muestras son sometidas a una concentración de 100% de lixiviado como es de esperarse, el comienzo del desarrollo se anula, dando a entender que en concentraciones de lixiviado superiores al 75% la probabilidad de tener un desarrollo normal es nula.

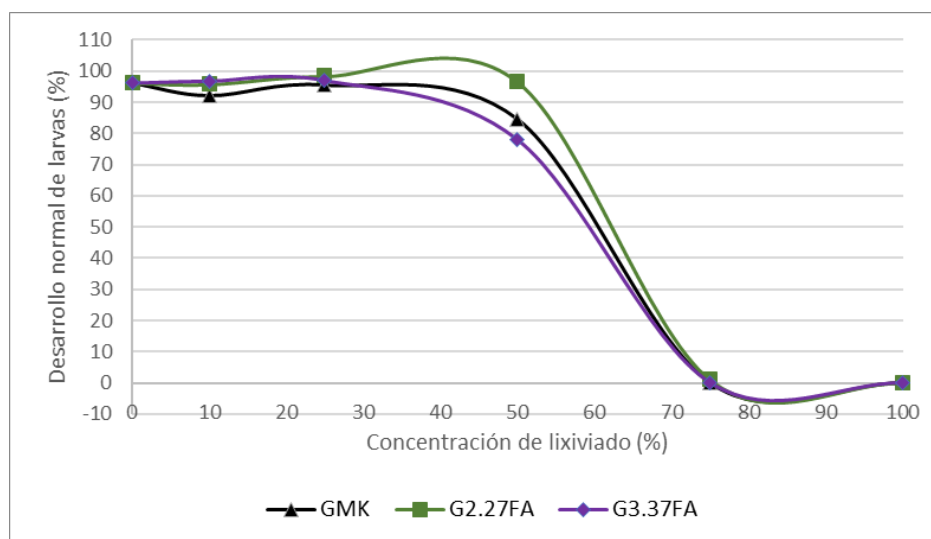


Figura 24: Curvas dosis-respuesta del desarrollo larvario respecto al nivel 0.

De la comparación de los valores de EC50 y EC20 mostrados en la Tabla 6 obtenidos a partir de los modelos dosis–respuesta, se observa que, aunque sus valores son similares, para provocar un 50% de la inhibición del desarrollo larvario es necesario tener una

concentración de lixiviado del 59% en caso del G3.37FA seguido por una de 60.5% en el GMK y de 61.5% para el producto G2.27FA, esto quiere decir que el efecto provocado por este último producto es menor. La toxicidad en orden descendente fue la siguiente: G3.37FA > GMK $\cong$ G2.27FA.

Tabla 6: Valores de EC50 y EC20 para los diferentes productos analizados expresados como porcentaje.

Muestra	EC20	EC50	LID
GMK	68	60.5	25
G2.27 FA	69	61.5	50
G3.3.7 FA	69.5	59	50

3.5. COMPARACIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el test de desarrollo larvario del erizo de mar *Paracentrotus lividus* muestran cierta correspondencia con el comportamiento de lixiviación (ensayo de lixiviación EN 12457–4) de los productos. Sin embargo, no se puede comparar con el test de reducción de la emisión de luz de *Vibrio fischeri* ya que muestra respuestas diferentes.

Para el parámetro EC20, las concentraciones de lixiviado del producto GMK son menores en el test de reducción de luminiscencia (19.2%) que en el de desarrollo larvario (68%). Esto quiere decir que a bajas concentraciones el test de luminiscencia registra un mayor efecto sobre la respuesta analizada (reducción de la emisión de luz e inhibición del desarrollo larvario, respectivamente). Sin embargo, a concentraciones más elevadas, no se registran valores de EC50 en el caso del test de reducción de la luminiscencia, mientras que, en el test de desarrollo larvario sí, lo que demuestra una mayor sensibilidad a concentraciones elevadas por parte de este organismo.

En comparación con el test de supervivencia de nauplii de *Artemia franciscana*, donde apenas se han registrado efectos significativos sobre el organismo de ensayo, el test de desarrollo larvario continúa siendo el más sensible a la potencial toxicidad de los AAMs evaluados.

El análisis de los resultados obtenidos permite concluir que el test de reducción de la luminiscencia de *Vibrio fischeri* podría considerarse un método rápido y económico de cribado, al igual que el test de supervivencia de nauplii de *Artemia franciscana*, siendo

este último menos sensible. La aplicación del test de desarrollo larvario del erizo de mar *Paracentrotus lividus* permite evaluar la ecotoxicidad de los AAMs con una mayor robustez de resultados. Además, demuestra una mayor sensibilidad a los posibles efectos en el medio ambiente gracias a la posibilidad de recoger más niveles de respuesta (endpoints) y, en consecuencia, se logran resultados estadísticamente mucho más fiables.

4. CONCLUSIONES

Se ha llevado a cabo una evaluación del impacto ambiental de materias primas: red mud (RM), ceniza volante (FA) y metacaolín (MK) y de los AAMs obtenidos a partir de ellas, que son utilizados para la fabricación de arrecifes artificiales (AR). La evaluación se ha llevado a cabo a través de un ensayo de lixiviación y tres tests de ecotoxicidad, basados en el contacto con tres organismos del medio acuático diferentes.

Del ensayo de lixiviación se destaca que el RM, como materia prima, mostró la mayor movilidad de elementos (Cr, Hg, Se, Mo) superando el límite de residuos inertes y siendo la única materia prima en superar el límite de residuos no peligrosos para dos elementos (V y As). El MK supera el límite de inertes para el elemento Se. Todos los productos superan los límites establecidos para residuos inertes en el caso de elemento como As, Cr, Se, V y fluoruros (F⁻). Aun así, todos los valores se encuentran por debajo del límite para definir un residuo como peligroso, establecido por la Directiva 1999/31/CEE.

Debido a que en este estudio se evalúan matrices complejas, los tests de ecotoxicidad permiten trasladar estos resultados a un efecto sobre los organismos que habitan el medio acuático. El test de reducción de la luminiscencia de *Vibrio fischeri*, refleja que los productos no presentan toxicidad, con valores del parámetro LID inferiores a 8.

El porcentaje de supervivencia de nauplii de *Artemia franciscana* tampoco demuestra toxicidad por parte de estas muestras.

El desarrollo larvario del erizo de mar *Paracentrotus lividus* permite observar diferencias sobre el efecto producido entre las muestras, con valores de EC50 de 59%, 60,5% y 61,5% para las muestras G3.37FA, GMK y G2.27FA, en orden decreciente, según su efecto sobre el desarrollo larvario.

El producto G2.27FA que incorpora una combinación de las 3 materias primas con una proporción menor de ceniza volante pero mayor de red mud, en comparación con el producto G3.37FA, muestra los mejores resultados. También es importante destacar que, mientras el comportamiento de lixiviación no se refleja en la luminiscencia de la bacteria *Vibrio fischeri* ni afecta la supervivencia de nauplii de *Artemia franciscana*, los resultados del desarrollo larvario del erizo de mar *Paracentrotus lividus* muestran cierta consistencia con la movilidad de los elementos químicos estudiados (en particular la presencia de As).

Por lo tanto, estos resultados respaldan el uso potencial del red mud como materia prima alternativa en la producción de ARs basados en AAMs, desde el punto de vista de la aceptabilidad ambiental. Además, se demuestra la conveniencia de realizar una evaluación ecotoxicológica que complemente el análisis químico.

5. BIBLIOGRAFÍA

AENOR. (2017). *CEN/TR 17105:2017*.

Asnicar, D., Cappelli, C., Sallehuddin, A. S., Maznan, N. A., & Marin, M. G. (2020). Effects of Glyphosate-Based and Derived Products on Sea Urchin Larval Development. *Journal of Marine Science and Engineering* 2020, Vol. 8, Page 661, 8(9), 661. <https://doi.org/10.3390/JMSE8090661>

Bandarra, B. S., Gomes, L. A., Pereira, J. L., Gonçalves, F. J. M., Martins, R. C., & Quina, M. J. (2020). Assessment of hazardous property HP 14 using ecotoxicological tests: a case study of weathered coal fly ash. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(17), 20972–20983. <https://doi.org/10.1007/S11356-020-08515-8/FIGURES/5>

Baudrot, V., & Charles, S. (2021). morse: an R-package to analyse toxicity test data. *Journal of Open Source Software*, 6(68), 3200. <https://doi.org/10.21105/JOSS.03200>

Bonaventura, R., Zito, F., Chiaramonte, M., Costa, C., & Russo, R. (2018). Nickel toxicity in *P. lividus* embryos: Dose dependent effects and gene expression analysis. *Marine*

Environmental Research, 139, 113–121.
<https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2018.05.002>

Camacho, C., Rocha, A. C., Barbosa, V. L., Anacleto, P., Carvalho, M. L., Rasmussen, R. R., Sloth, J. J., Almeida, C. M., Marques, A., & Nunes, M. L. (2018). Macro and trace elements in *Paracentrotus lividus* gonads from South West Atlantic areas. *Environmental Research*, 162, 297–307.
<https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2018.01.018>

Carral, L., Fabal, C. C., Galdo, M. I. L., Rodríguez-Guerreiro, M. J., & Barros, J. J. C. (2020). Assessment of the Materials Employed in Green Artificial Reefs for the Galician Estuaries in Terms of Circular Economy. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2020, Vol. 17, Page 8850, 17(23), 8850.
<https://doi.org/10.3390/IJERPH17238850>

CEN. (2002). *Caracterización de residuos - Lixiviación - Ensayo de conformidad para la lixiviación de residuos granulares y lodos*.

Charles, S., Veber, P., & Delignette-Muller, M. L. (2018). MOSAIC: a web-interface for statistical analyses in ecotoxicology. *Environmental Science and Pollution Research*, 25(12), 11295–11302. <https://doi.org/10.1007/S11356-017-9809-4/TABLES/5>

Chiarelli, R., Martino, C., Roccheri, M. C., & Cancemi, P. (2021). Toxic effects induced by vanadium on sea urchin embryos. *Chemosphere*, 274, 129843.
<https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.129843>

Cui, W., Cui, Q., Dong, X., Liu, J., Song, K., Xie, M., & Yao, X. (2024). Current research status and emerging trends in utilization of red mud resources: A study based on bibliometric network analysis. *Construction and Building Materials*, 442, 137605.
<https://doi.org/10.1016/J.CONBUILDMAT.2024.137605>

Deng, B., Wang, X., Luong, D. X., Carter, R. A., Wang, Z., Tomson, M. B., & Tour, J. M. (2022). Rare earth elements from waste. *Science Advances*, 8(6).
https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABM3132/SUPPL_FILE/SCIADV.ABM3132_SM.PD

F

- Dharmaraj, S., Ashokkumar, V., Hariharan, S., Manibharathi, A., Show, P. L., Chong, C. T., & Ngamcharussrivichai, C. (2021). The COVID-19 pandemic face mask waste: A blooming threat to the marine environment. *Chemosphere*, 272, 129601. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.129601>
- Directorate-General for Health and Consumers. (2013). Toxicity and assessment of chemical mixtures. *European Commission*. <https://doi.org/10.2772/21444>
- Du, P., Wang, P., Zhang, X., Wen, G., & Wang, Y. (2024). Properties, hazards and valuable metal recovery technologies of red mud: A review. *Particuology*, 93, 328–348. <https://doi.org/10.1016/J.PARTIC.2024.07.010>
- Ellen MacArthur Foundation. (2019). *The circular economy in detail | Ellen MacArthur Foundation*. <https://www.ellenmacarthurfoundation.org/the-circular-economy-in-detail-deep-dive>
- Fernández, N., & Beiras, R. (2001). Combined toxicity of dissolved mercury with copper, lead and cadmium on embryogenesis and early larval growth of the *Paracentrotus lividus* sea-urchin. *Ecotoxicology*, 10(5), 263–271. <https://doi.org/10.1023/A:1016703116830>,
- Fichet, D., & Miramand, P. (1998). Vanadium toxicity to three marine invertebrates larvae: *Crassostrea gigas*, *Paracentrotus lividus* and *Artemia salina*. *Chemosphere*, 37(7), 1363–1368. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(98\)00118-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(98)00118-0)
- Galdo, M. I. L., Guerreiro, M. J. R., Vigo, J. L., Rodriguez, I. A., Lorenzo, R. V., Couce, J. C. C., & Couce, L. C. (2022). Definition of an Artificial Reef Unit through Hydrodynamic and Structural (CFD and FEM) Models—Application to the Ares-Betanzos Estuary. *Journal of Marine Science and Engineering* 2022, Vol. 10, Page 230, 10(2), 230. <https://doi.org/10.3390/JMSE10020230>
- Gambardella, C., Morgana, S., Ferrando, S., Bramini, M., Piazza, V., Costa, E., Garaventa, F., & Faimali, M. (2017). Effects of polystyrene microbeads in marine planktonic crustaceans. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 145, 250–257. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2017.07.036>

- Garmendia, J. M., Menchaca, I., Belzunce, M. J., Franco, J., & Revilla, M. (2009). Induction to maturation of the sea urchin *Paracentrotus lividus* (Lamarck, 1816) under laboratory conditions. *Environmental Technology*, 30(13), 1441–1446. <https://doi.org/10.1080/09593330903200744>;REQUESTEDJOURNAL:JOURNAL:TE NT20;WGROU:STRING:PUBLICATION
- Gartiser, S., Heisterkamp, I., Schoknecht, U., Bandow, N., Burkhardt, N. M., Ratte, M., & Ilvonen, O. (2017). Recommendation for a test battery for the ecotoxicological evaluation of the environmental safety of construction products. *Chemosphere*, 171, 580–587. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2016.12.115>
- German Institute for Building Technology. (2017). *Model administrative regulations for technical building regulations (MVV TB)* (2017th ed.). https://www.dibt.de/fileadmin/dibt-website/Dokumente/Referat/P5/Bauregellisten/MVV_TB_2017-1_inkl_Druckfehlerkorrektur.pdf
- Goelz, T., Vogt, B., & Hartley, T. (2020). Alternative Substrates Used for Oyster Reef Restoration: A Review. *https://doi.org/10.2983/035.039.0101*, 39(1), 1–12. <https://doi.org/10.2983/035.039.0101>
- Gonçalves, N. P. F., da Silva, E. F., Tarelho, L. A. C., Labrincha, J. A., & Novais, R. M. (2024). Simultaneous removal of multiple metal(loid)s and neutralization of acid mine drainage using 3D-printed bauxite-containing geopolymers. *Journal of Hazardous Materials*, 462. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.132718>
- Guo, Z., Wang, L., Cong, W., Jiang, Z., & Liang, Z. (2021). Comparative Analysis of the Ecological Succession of Microbial Communities on Two Artificial Reef Materials. *Microorganisms* 2021, Vol. 9, Page 120, 9(1), 120. <https://doi.org/10.3390/MICROORGANISMS9010120>
- Hook, S. E., Gallagher, E. P., & Batley, G. E. (2014). The role of biomarkers in the assessment of aquatic ecosystem health. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 10(3), 327–341. <https://doi.org/10.1002/IEAM.1530>

- Ishaque, A. B., Johnson, L., Gerald, T., Boucaud, D., Okoh, J., & Tchounwou, P. B. (2006). Assessment of Individual and Combined Toxicities of Four Non-Essential Metals (As, Cd, Hg and Pb) in the Microtox Assay. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2006, Vol. 3, Pages 118-120, 3(1), 118–120. <https://doi.org/10.3390/IJERPH2006030014>
- Jovičević-Klug, M., Souza Filho, I. R., Springer, H., Adam, C., & Raabe, D. (2024). Green steel from red mud through climate-neutral hydrogen plasma reduction. *Nature*, 625(7996), 703–709. <https://doi.org/10.1038/S41586-023-06901-Z>,
- Khairul, M. A., Zanganeh, J., & Moghtaderi, B. (2019). The composition, recycling and utilisation of Bayer red mud. *Resources, Conservation and Recycling*, 141, 483–498. <https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2018.11.006>
- Khosrovyan, A., Rodríguez-Romero, A., Salamanca, M. J., Del Valls, T. A., Riba, I., & Serrano, F. (2013). Comparative performances of eggs and embryos of sea urchin (*Paracentrotus lividus*) in toxicity bioassays used for assessment of marine sediment quality. *Marine Pollution Bulletin*, 70(1–2), 204–209. <https://doi.org/10.1016/J.MARPOLBUL.2013.03.006>
- Kobayashi, N., & Okamura, H. (2004). Effects of heavy metals on sea urchin embryo development. 1. Tracing the cause by the effects. *Chemosphere*, 55(10), 1403–1412. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2003.11.052>
- Kong, J., Cong, G., Ni, S., Sun, J., Guo, C., Chen, M., & Quan, H. (2022). Recycling of waste oyster shell and recycled aggregate in the porous ecological concrete used for artificial reefs. *Construction and Building Materials*, 323, 126447. <https://doi.org/10.1016/J.CONBUILDMAT.2022.126447>
- Li, G., Liu, J., Yi, L., Luo, J., & Jiang, T. (2024). Bauxite residue (red mud) treatment: Current situation and promising solution. *Science of The Total Environment*, 948, 174757. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2024.174757>
- Li, W. C., Tse, H. F., & Fok, L. (2016). Plastic waste in the marine environment: A review of sources, occurrence and effects. *Science of The Total Environment*, 566–567, 333–349. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.05.084>

- Li, X., Dong, R., Zhang, R., Zhang, Y., Lu, P., Meng, X., & Li, P. (2025). Performance improvement and the mechanisms of red mud oxygen carrier in chemical looping gasification using strontium doping strategy. *Chemical Engineering Journal*, 508, 160772. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2025.160772>
- Li, X., Lu, P., Zhang, Y., Meng, X., Zhou, E., & Zhang, B. (2025). Co-production of high-quality syngas and valuable elements: combination of chemical looping gasification and acid leaching to cleanly dispose red mud solid waste. *Journal of Cleaner Production*, 522, 146307. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2025.146307>
- Lima, J. S., Zalmon, I. R., & Love, M. (2019). Overview and trends of ecological and socioeconomic research on artificial reefs. *Marine Environmental Research*, 145, 81–96. <https://doi.org/10.1016/J.MARENVRES.2019.01.010>
- Liu, W., Chen, X., Li, W., Yu, Y., & Yan, K. (2014). Environmental assessment, management and utilization of red mud in China. *Journal of Cleaner Production*, 84(1), 606–610. <https://doi.org/10.1016/J.JCLEPRO.2014.06.080>
- Liu, X., Han, Y., He, F., Gao, P., & Yuan, S. (2021). Characteristic, hazard and iron recovery technology of red mud - A critical review. *Journal of Hazardous Materials*, 420, 126542. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2021.126542>
- Liu, X., Liu, X., & Zhang, Z. (2024). Application of red mud in carbon capture, utilization and storage (CCUS) technology. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 202, 114683. <https://doi.org/10.1016/J.RSER.2024.114683>
- Manfra, L., Canepa, S., Piazza, V., & Faimali, M. (2016). Lethal and sublethal endpoints observed for *Artemia* exposed to two reference toxicants and an ecotoxicological concern organic compound. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 123, 60–64. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2015.08.017>
- Mariaková, D., Mocová, K. A., Fořtová, K., Ryparová, P., Pešta, J., & Pavlů, T. (2021). Ecotoxicity and Essential Properties of Fine-Recycled Aggregate. *Materials* 2021, Vol. 14, Page 463, 14(2), 463. <https://doi.org/10.3390/MA14020463>

- Nagalakshmi, R., Rameshwaran, P. M., Nithyambigai, & Stella Mary, F. (2021). Material analysis of artificial reef structure using silica fume and their corresponding Review about the structural material. *Materials Today: Proceedings*, 46, 3677–3683. <https://doi.org/10.1016/J.MATPR.2021.01.846>
- Nováková, J., Daňová, D., & Mičková, H. (n.d.). *Zinc and Cadmium Toxicity Using a Biotest with Artemia franciscana*. <https://doi.org/10.2754/avb200776040635>
- Orveillon, G., Pierri, E., Egle, L., Gerbendahl, A., Wessman, P., García, J. E., & Saveyn, H. (2022). Scoping possible further EU-wide end-of-waste and by-product criteria. *Publications Office of the European Union, March*, 108. <https://doi.org/10.2760/067213>
- Pan, X., Wu, H., Lv, Z., Yu, H., & Tu, G. (2023). Recovery of valuable metals from red mud: A comprehensive review. *Science of The Total Environment*, 904, 166686. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2023.166686>
- Peixoto, D., Torreblanca, A., Pereira, S., Vieira, M. N., & Varó, I. (2022). *Effect of short-term exposure to fluorescent red polymer microspheres on Artemia franciscana nauplii and juveniles*. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15992-y/Published>
- Reis, B., van der Linden, P., Pinto, I. S., Almada, E., Borges, M. T., Hall, A. E., Stafford, R., Herbert, R. J. H., Lobo-Arteaga, J., Gaudêncio, M. J., Tuaty-Guerra, M., Ly, O., Georges, V., Audo, M., Sebaibi, N., Boutouil, M., Blanco-Fernandez, E., & Franco, J. N. (2021). Artificial reefs in the North –East Atlantic area: Present situation, knowledge gaps and future perspectives. *Ocean & Coastal Management*, 213, 105854. <https://doi.org/10.1016/J.OCECOAMAN.2021.105854>
- Rodrigues, P., Silvestre, J. D., Flores-Colen, I., Viegas, C. A., de Brito, J., Kurad, R., & Demertzi, M. (2017). Methodology for the assessment of the ecotoxicological potential of construction materials. *Materials*, 10(6). <https://doi.org/10.3390/MA10060649>
- Santos, J., Cifrian, E., Rodriguez-Romero, A., Yoris-Nobile, A. I., Blanco-Fernandez, E., Castro-Fresno, D., & Andres, A. (2023). Assessment of the environmental acceptability of potential artificial reef materials using two ecotoxicity tests:

- Luminescent bacteria and sea urchin embryogenesis. *Chemosphere*, 310. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136773>
- Stiernström, S., Enell, A., Wik, O., Borg, H., & Breitholtz, M. (2014). An ecotoxicological evaluation of aged bottom ash for use in constructions. *Waste Management*, 34(1), 86–92. <https://doi.org/10.1016/J.WASMAN.2013.10.003>
- Suman, T. Y., Jia, P. P., Li, W. G., Junaid, M., Xin, G. Y., Wang, Y., & Pei, D. S. (2020). Acute and chronic effects of polystyrene microplastics on brine shrimp: First evidence highlighting the molecular mechanism through transcriptome analysis. *Journal of Hazardous Materials*, 400, 123220. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2020.123220>
- Suzdaleva, A. L., & Beznosov, V. N. (2021). Artificial Reef: Status, Life Cycle, and Environmental Impact Assessment. *Power Technology and Engineering*, 55(4), 558–561. <https://doi.org/10.1007/S10749-021-01397-X/METRICS>
- UNEP. (2009). *Guidelines for the Placement of Artificial Reefs*.
- UNEP. (2012). *UNEP 2012 annual report | UNEP - UN Environment Programme*. <https://www.unep.org/resources/annual-report/unep-2012-annual-report>
- Varó, I., Perini, A., Torreblanca, A., Garcia, Y., Bergami, E., Vannuccini, M. L., & Corsi, I. (2019). Time-dependent effects of polystyrene nanoparticles in brine shrimp *Artemia franciscana* at physiological, biochemical and molecular levels. *Science of The Total Environment*, 675, 570–580. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2019.04.157>
- 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. *Environment International*, 31(7), 1065–1077. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2005.05.017>
- Wu, P., Liu, X., Zhang, Z., Wei, C., Wang, J., & Gu, J. (2024). The harmless and value-added utilization of red mud: Recovering iron from red mud by pyrometallurgy and

- preparing cementitious materials with its tailings. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 132, 50–65. <https://doi.org/10.1016/J.JIEC.2023.11.038>
- Xu, K., Lin, Q., Fan, X., Zheng, J., Liu, Y., Ma, Y., & He, J. (2023). Enhanced degradation of sulfamethoxazole by activation of peroxodisulfate with red mud modified biochar: Synergistic effect between adsorption and nonradical activation. *Chemical Engineering Journal*, 460, 141578. <https://doi.org/10.1016/J.CEJ.2023.141578>
- Xu, Q., Ji, T., Yang, Z., & Ye, Y. (2019). Preliminary investigation of artificial reef concrete with sulphoaluminate cement, marine sand and sea water. *Construction and Building Materials*, 211, 837–846. <https://doi.org/10.1016/J.CONBUILDMAT.2019.03.272>
- Zhao, Z., Wang, B., Feng, Q., Chen, M., Zhang, X., & Zhao, R. (2023). Recovery of nitrogen and phosphorus in wastewater by red mud-modified biochar and its potential application. *Science of The Total Environment*, 860, 160289. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.160289>