



APLICACIÓ DE TÈCNiques ECOTOXICOLÒGIQUES EN DIFERENTS MATRIUS AMBIENTALS. VIABILITAT I COMPLEMENTARIETAT

Neus Roig Montserrat

Dipòsit Legal: T. 1434-2012

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

WARNING. Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

Neus Roig Montserrat

**APLICACIÓ DE TÈCNiques
ECOTOXICOLÒGIQUES EN DIFERENTS
MÀTRIS AMBIENTALS. VIABILITAT I
COMPLEMENTARIETAT**

TESI DOCTORAL

Dirigida per:

Dra. Marta Schuhmacher Ansuategui

Dr. Jordi Sierra Llopart

Dr. Martí Nadal Lomas

Departament d'Enginyeria Química
Grup d'Anàlisi i Gestió Ambiental



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2012



Departament d'Enginyeria Química

Av. Països Catalans, 26

Campus Sescelades

43007 Tarragona

Tel.: 977 55 8675

Fax: 977 55 9621

La Dra. Marta Schuhmacher Ansuategui, el Dr. Jordi Sierra Llopart i el Dr. Martí Nadal Lomas

CERTIFIQUEM QUE

aquest treball, titulat “Aplicació de tècniques ecotoxicològiques en diferents matrius ambientals. Viabilitat i complementarietat”, que presenta Neus Roig Montserrat per a l’obtenció del títol de Doctor, ha estat realitzat sota la nostra direcció al Departament d’Enginyeria Química d’aquesta universitat.

Tarragona, 26 de setembre de 2012-09-21

El director de la tesi doctoral

Els codirectors de la tesi doctoral

Dra. Marta Schuhmacher Ansuategui, Dr. Jordi Sierra Llopart, Dr. Martí Nadal Lomas

A la meva família

Agraïments

Per començar i per no deixar-me a ningú, m'agradaria agrair a tota aquella gent que m'ha fet costat en aquests quatre anys que precedeixen aquesta tesi.

Primer de tot, voldria mostrar el meu agraïment als meus directors de tesi i al Dr. Domingo, per la confiança que vau dipositar en oferir-me entrar a formar part del grup. Marta, Martí i Jordi, moltes gràcies a tots. Jordi, gràcies especialment per la paciència d'ensenyar, les teves ganes de fer de la ciència un món apassionant i sobretot, per donar-me ànims en els moments més baixos d'aquests quatre anys.

També aprofito per donar les gràcies a tots aquells que heu contribuït d'alguna manera en la realització d'aquesta tesi. Gràcies als laboratoris de Labaqua S.A. pels anàlisis de contaminants orgànics dels fangs; als Serveis Científicotècnics de la UB pels anàlisis de metalls, als laboratoris de SGS de Bèlgica pels anàlisis de PCDD/Fs i al CSIC pels anàlisis de contaminants orgànics dels SPMDs.

Gràcies a tots els que esteu o heu passat per l'AGA i TECNATOX per compartir molts bons moments. A tots els companys del 213, gràcies per aguantar els meus dies d'indignació, gràcies Quim per ser al meu costat des del primer dia que varem entrar; segur que des de Reus em trobes a faltar!. Merci Amores per tenir sempre una espatlla a punt per escoltar-me i animar-me; amunt la terra ferma! Gràcies Montse Mari per la gran calma que sempre m'has transmès, gràcies Francesc per compartir les hores de mostreig i no despertar-me en les adormides de camí a Ascó; als internacionals fixes i

internacionals que passen: አመሰግናለሁ Eskinder, Fàtima شكريه, i शुकुरिये Vikas.

Rodrigo, Renatto, Ana Paula, Laura, Carolina, Ju, gràcies a tots per la barreja cultural que feu al grup. Gràcies també als que hi éreu quan vaig arribar i que de mica en mica us heu anat col·locant per altres llocs. Gràcies Ana per perdonar-me que el primer dia que vingués a casa teva fos per ajudar-te a fer la mudança....tenim un mate pendent, ho se!, Isabela, gràcies pel bon rolo i l'energia que aportaves al grup. Aviat, aviat, et vinc a veure! Merci Jaume Bori pel bon rolo concentrat dels dies que vas estar per aquí; Oda, encara dubtes de fer el doctorat?, merci Jor i tota la família, a la Montse Meneses, el Rafa, i a tots els que heu contribuït algun dia en crear aquesta bona harmonia al 213!. Com no, moltíssimes gràcies a l'adoptada de l'AGA: gràcies Pepa per les hores de piscina, cafès al Sunset i sobretot gràcies per deixar-me participar de les teves convocatòries massives!

Gràcies també a tota la gent de Reus, del Laboratori de Toxicò i TECNATOX en general. Gràcies a les nenes per fer de les visites al Baix Camp un plaer! Merci Gemma, Lolita, Bea, Roser i especialment a la Is pels kilòmetres recorreguts i la bona companyia en els viatges. Gràcies Núria per donar-me un cop de mà sempre que ho necessités, i en general, gràcies a totes per ensenyar-me a jugar a la Wii i a saber estalviar a l'hora de fer la compra! Gràcies també Jaume F., que tot i ser dels de Reus, casi que et tenim adoptat a Tarragona.

Gràcies també a tot el grup d'Edafologia de la UB, especialment al Robert per deixar-me ocupar el vostre laboratori de tant en tant; moltíssimes gràcies també a l'Esther pel teu bon rollo i gràcies Brezana per les teves converses i per fer pujar l'ànim de qualsevol independentista desmotivats! Re-gràcies Jordi per presentar-me aquest grupet tant maco.

Gràcies també a la colla, que sempre hi heu estat. Clàudia, Toni, Maria, Jordi, Laia, Lina, Sebas, Sara, Raül, Enric, Irina, Ramon i Joan, Juli, David i Pau, Roser, Èrika, i en general a tots aquells que ens coneixem de sempre i en algun moment m'heu preguntat...però ara tu què estàs fent exactament? Gràcies Eli per enrecordar-te'n del primer dia que havia de dipositar! Cosetes d'aquestes són suficients per animar el dia a la gent! Merci en especial a tots els companys de ruta i muntanya, i en especial a valtros, Vat, Zinho, per les vegades que em vareu ajudar a pujar o baixar d'un cim, perquè el moment en que la vida va decidir abandonar-vos estava immersa en la recta final d'aquesta tesi i perquè tant de bo no us l'hagués hagut d'agrair mai ...ja ho sabeu, sempre seguireu caminant en els nostres cors!

Per últim, moltíssimes gràcies als que tant en dies bons com dolents, dies de rialles i optimisme o dies de plors i pessimisme, sempre hi heu estat. Gràcies mama, gràcies papa i gràcies Anna per aguantar els meus dies de 'mala llet'! Gràcies especialment a l'àvia, la Consol, per fer-te contenta simplement quan et contesto <<si, àvia, però ara cobro!>> quan vostè em pregunta si encara estudio. I, moltíssimes gràcies Joan Pau per estar cada dia al meu costat i aguantar els meus nervis de ben a prop...ja ho saps que sempre jo més!

Espero no deixar-me a ningú, però sou molts els que en algun moment heu estat vinculats a la meua vida aquests quatre anys de tesi, així que no voldria que s'ofengués ningú si me'l deixo. Gràcies a tots i totes els que heu posat un granet de sorra perquè això sigui possible.

Llistat de continguts

Resum	XV
Abstract	XI
Capítol I. Introducció, hipòtesi, objectius i metodologia	1
1. Introducció	3
1.1 Ecotoxicologia i toxicologia ambiental	3
1.2 Conceptes	4
1.3 Característiques principals dels contaminants estudiats	5
1.3.1 Compostos orgànics	5
1.3.2 Metalls i Metal·loides	15
1.4 Dinàmica de contaminants en el medi	21
1.5 Biodisponibilitat	25
1.6 Bioacumulació, biotransformació, biodegradació, bioconcentració i biomagnificació	27
1.7 Nivells d'actuació dels contaminants.....	28
1.8 Avaluació de la toxicitat: bioassajos	30
1.9 Interrelació entre els tres compartiments ambientals: atmosfera, hidrosfera i litosfera	31
1.10 Hipòtesi	34
1.11 Objectius	35
2. Metodologia	37
2.1 Mètodes generals de mostreig	37
2.1.1 Mostreig de sòls, sediment i residus	37
2.1.2 Mostreig d'aigua fluvial	38
2.1.3 Mostreig de partícules ambientals PM ₁₀	42
2.2 Anàlisi de contaminants	42
2.2.1 Metalls i metal·loides	42
2.2.2 Contaminants orgànics	43
2.3 Bioassajos	44
2.3.1 Microtox [®] - <i>Vibrio fischeri</i>	45

2.3.2 Test d'inhibició del creixement d'algues d'aigua dolça. <i>Pseudokirschneriella subcapitata (Selenastrum capricornutum)</i>	47
2.3.3 Tests d'avaluació de la fitotoxicitat	48
2.3.4 Paràmetres indicadors de la funció del sòl	50
2.3.5 Tests de citotoxicitat i genotoxicitat	53
2.4 Anàlisi estadística	55
Capítol II. Aigües i sediments fluvials	57
▪ Resum de l'article	59
▪ Novel approach for assessing heavy metal pollution and ecotoxicological status of rivers by means of passive sampling methods <i>Publicat a Environment International 37:671-677 (2011)</i>	60
▪ Discussió del capítol II	81
Capítol III. Residus orgànics: fangs de depuradora	85
▪ Resum de l'article	87
▪ Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants <i>Publicat a Science of the Total Environment, 425: 99-109 (2012)</i>	88
▪ Discussió del capítol III.....	115
Capítol IV. Sòls	117
▪ Resum del capítol IV.....	119
▪ Resum de l'Article.....	121
▪ Long-term amendment of Spanish soils with sewage sludge: Effects on soil functioning <i>Publicat a: Agriculture, Ecosystems and Environment 158: 41-48 (2012) ...</i>	122
▪ Resum del capítol de llibre	141
▪ Amendment of Soils with Composted Sewage Sludge. Long Term Effects on C and N Transformation. <i>Publicat al llibre Soil Enzymology in the Recycling of Organic Wastes and Environmental Restoration (2012)</i>	142
▪ Discussió del capítol IV	157

Capítol V. Aire	161
▪ Resum de l'article	163
▪ In Vitro Tests to Assess Toxic Effects of Airborne PM ₁₀ Samples. Correlation with Chemical Pollutants <i>Sotmès a Science of the Total Environment</i>	164
▪ Discussió del capítol V	183
Capítol VI. Discussió general i conclusions	185
1. Discussió general	187
2. Conclusions	191
Bibliografia	195
ANNEX I. Anàlisi de compostos orgànics apolars en aigües fluvials a partir del mostreig amb SPMDs. Correlació amb el grau de toxicitat.	i
ANNEX II. Resultats de les anàlisis d'elements potencialment tòxics dels sòls estudiats a Montroig del Camp	v

Llistat d'acrònims

- ARC: agència de residus de Catalunya
- ATSDR: agència americana per a substàncies tòxiques i el registre de malalties
- BR: respiració basal
- COPs.: compostos orgànics persistents
- CR: respiració acumulada
- DGTs: diffusive gradient in thin films (mostrejadors passius de metalls)
- DHA: activitat deshidrogenasa
- DMSO: dimetilsulfòxid
- DOC: carboni orgànic dissolt/matèria orgànica dissolta
- EC₅₀: concentració efectiva 50
- EDAR: estació depuradora d'aigües residuals
- HCB: hexaclorobenzè
- HPLC: cromatografia líquida d'alta pressió
- HRGC: cromatografia de gasos d'alta resolució
- IARC: agència internacional de recerca sobre el càncer
- ICP-MS: espectrometria de masses de plasma acoblat inductivament
- ICP-OES: espectrometria d'emissió òptica de plasma acoblat inductivament
- McTx: Microtox[®]
- NPEs: nonilfenols
- OECD: organització per a la cooperació econòmica i el desenvolupament
- OMS/WHO: organització mundial de la salut
- PAHs: hidrocarburs aromàtics policíclics
- PCDD/Fs: dibenzo-*p*-dioxines i dibenzofurans policlorats
- PCBs: bifenils policlorats
- PCN: naftalens policlorats
- PM: material particulat
- PM₁₀: material particulat menor de 10 micròmetres de diàmetre
- PTE: elements potencialment tòxics
- PBDEs: difenil èters polibromats
- POPs: compostos orgànics persistents
- SIR: respiració induïda per substrat

SOM: mapes auto organitzatius

SPE: extracció en fase sòlida

SPMDs: semi permeable membrane devices (mostrejadors passius de compostos orgànics)

TI: índex de toxicitat

UA: activitat ureasa

UE: Unió Europea

US EPA: agència de protecció ambiental dels Estats Units

WWTP: plantes de tractament d'aigües residuals

Resum

Les previsions de creixement de la població mundial per a l'any 2015 són d'aproximadament 8000 milions de persones, quatre vegades més que a començaments del segle XX. Aquest progressiu augment de població en les últimes dècades ha portat associat un augment en l'impacte ambiental global. Una de les principals conseqüències d'aquest impacte humà ha estat la contaminació dels diferents compartiments ambientals, com són l'atmosfera, l'edafosfera i la hidrosfera. Degut a la interrelació que existeix entre aquests compartiments, és important tenir present, que l'impacte sobre un d'ells pot portar conseqüències sobre la resta. Són molts els decrets legislatius i normatives imposades per tal d'intentar controlar els nivells de contaminants que s'alliberen al medi, però en poques ocasions es quantifica l'efecte que poden causar als ecosistemes. Quan s'estudia la contaminació d'una matriu ambiental, ja sigui el sòl, l'aire o les aigües, sovint s'analitza un número determinat de contaminants, diferents en funció de l'interès de l'estudi. Tanmateix, aquestes mostres ambientals integren multitud de contaminants tant químics, físics, com biològics que poden afectar de manera diferent als ecosistemes. És a dir, l'anàlisi de contaminants d'una mostra ambiental ens pot donar una orientació del grau de contaminació d'aquella matriu i del possible efecte que pot arribar a causar a l'ecosistema, però per tal de poder conèixer la toxicitat real d'aquestes mostres, és necessari la realització de bioassajos d'ecotoxicitat amb organismes representatius de cada matriu. Només així es pot tenir una idea més realista de l'efecte de la contaminació. És per això que la combinació d'anàlisis de contaminants amb l'aplicació de bioassajos permet fer un millor diagnòstic de l'estat real dels ecosistemes.

Aquesta tesi demostra que la complementarietat dels estudis químics i ecotoxicològics és important a l'hora de realitzar una bona avaluació ambiental en els principals compartiments ambientals de la Terra, com són aigua, sòl, sediments i aire. D'aquesta manera, a partir de la diagnosi química i ecotoxicològica de les diferents matrius ambientals, es poden donar consells i recomanacions de mostreig, d'anàlisi i d'aplicació de tests a l'hora de realitzar una bona diagnosi ambiental.

S'han realitzat anàlisis de metalls, metal·loides i compostos orgànics en mostres ambientals dels diferents compartiments, i aquests s'han complementat amb tests per

avaluar-ne la toxicitat. Com ja s'ha comentat, a l'hora d'estudiar l'ecotoxicitat de mostres de diferents matrius ambientals, és interessant utilitzar organismes diana adequats a cada matriu. En aquest cas, per avaluar l'ecotoxicitat de les mostres d'aigua dolça, s'ha triat l'alga *Pseudokirschneriella subcapitata*, mentre que per avaluar l'ecotoxicitat de mostres de sòl i residus orgànics, s'han escollit plantes d'interès com són *Allium cepa*, *Raphanus sativus* i *Lolium perenne*. Per últim, també s'han utilitzat tests de toxicitat humana *in vitro* per avaluar la toxicitat humana de les partícules PM₁₀ de l'aire amb cèl·lules de pulmó (línia A549 procedent de carcinoma pulmonar humà). En tots els casos, s'ha realitzat també l'assaig ecotoxicològic amb el bacteri luminescent *Vibrio fischeri*, per avaluar la seva idoneïtat en les diferents matrius ambientals. Per tal de facilitar la lectura dels resultats d'aquesta tesi, s'han diferenciat quatre apartats que corresponen a quatre estudis realitzats amb mostres d'aigua i sediments fluvials, fangs de depuradora, sòls esmenats amb aquests residus i aire.

El *Capítol I* de la tesi inclou un primer apartat introductori, on es parla de l'ecotoxicologia i es realitza una breu descripció de les característiques dels contaminants i el seu comportament en el medi. Es plantegen les hipòtesis del treball amb l'objectiu general i els específics de la tesi, i per últim, s'inclou un resum de la metodologia bàsica emprada en els diferents capítols de la tesi.

En el *Capítol II* es presenta un estudi realitzat en aigües i sediments fluvials en un total d'onze rius de la xarxa fluvial catalana. En ell s'han combinat tècniques de mostreig passiu de contaminants en aigües fluvials amb bioassajos d'ecotoxicitat. A partir de sistemes DGT (*Diffusive Gradient in Thin Films*) i dispositius SPMD (*Semi Permeable Membrane Devices*), s'ha estimat la fracció biodisponible de metalls i compostos orgànics, respectivament. També s'ha analitzat la concentració de metalls en sediments. Els resultats de l'anàlisi de contaminants d'aigües i sediments s'han completat amb una bateria de tests d'ecotoxicitat amb el bacteri bioluminescent *Vibrio fischeri* i l'alga d'aigua dolça *Pseudokirschneriella subcapitata*. La combinació d'aquestes tècniques en aigua i sediments ha permès observar la importància del sediment com a reservori de contaminants per a la columna d'aigua i com a possible font en cas que les condicions del riu variessin. L'aplicació de test d'ecotoxicitat en extractes de mostrejadors passius (DGT i SPMD), ha permès determinar l'ecotoxicitat potencial de la fracció

biodisponible dels contaminants presents a l'aigua, no observable a partir d'anàlisis d'ecotoxicitat amb mostres d'aigua fluvial puntual.

El *Capítol III* presenta un treball destinat a l'estudi d'un residu orgànic de gran interès ambiental, com són els fangs de depuradora. La gestió d'aquests residus es centra en tres línies bàsiques: i) l'aplicació com a esmena orgànica en sòls agrícoles, suposant un risc pel mateix sòl i les aigües subterrànies; ii) l'aplicació com a combustible alternatiu d'indústries, suposant un risc per a la contaminació atmosfèrica; iii) o la disposició en abocadors controlats, suposant un risc per la contaminació del sòl i les aigües. Entre el 40 i 50% dels fangs de depuradora generats a Europa s'acaben reciclant a través de sòls agrícoles. Per aquest motiu, s'ha caracteritzat una mostra representativa de fangs de depuradora amb l'objectiu de valorar-ne el nivell de contaminants (metalls i compostos orgànics), la toxicitat derivada d'aquests, i veure la influència que té el tractament a les plantes depuradores sobre aquests paràmetres. Els resultats han indicat que el tipus de tractament aplicat als fangs influeix poc en la càrrega de contaminants (exceptuant alguns PBDEs i compostos fenòlics), però en canvi condiciona molt el contingut en matèria seca, nitrogen i sobretot l'estabilitat de la matèria orgànica. Alhora, el grau d'estabilitat de la matèria orgànica ha semblat ser el factor més determinant en la fitotoxicitat i l'ecotoxicitat, essent el compostatge, seguit dels tractaments tèrmics els mètodes que més detoxifiquen aquest tipus de residus. Es conclou que l'aplicació d'anàlisis no rutinaris (p.ex. compostos fenòlics totals) en l'avaluació dels fangs de depuradora, pot ser un paràmetre interessant a l'hora de predir la possible fitotoxicitat d'aquests residus.

El *Capítol IV* es centra en la matriu ambiental que serveix de suport per gran part de la vida del planeta Terra; és a dir, el sòl. Aquest capítol inclou dos treballs on es recullen dades sobre els canvis en la fertilitat del sòl, l'acumulació de contaminants, els efectes sobre el funcionament dels cicles del C i N, i l'ecotoxicitat i la fitotoxicitat com a conseqüència de l'aplicació de fangs de depuradora i fangs compostats en sòls agrícoles. Els resultats han indicat que l'aplicació de residus orgànics (fangs i fangs compostats) millora la quantitat i qualitat de la matèria orgànica i el contingut de nitrogen, però alhora incrementa el contingut de fenols solubles, s'acumulen metalls i alguns contaminants orgànics (PAHs, PCBs, PBDEs, PCNs). L'estudi també ha permès observar que l'aportació repetitiva i incontrolada de fangs pot provocar desequilibris en

el cicle del C i N i provocar problemes de contaminació d'aqüífers per nitrats, aspecte molt important sobretot en les zones vulnerables de Catalunya. Per tal d'evitar problemes d'acumulació de contaminants, de contaminació d'aigües subterrànies i de funcionament del sòl, es recomana fer aportes de fangs de depuradora urbana digerits anaeròbicament a dosis de 40 Mg ha⁻¹ cada dos anys, en el cas de sòls calcaris i de textura fina.

El Capítol V està dedicat a la matriu ambiental imprescindible pels organismes terrestres: l'aire. Per un costat s'ha estudiat la idoneïtat de diferents tests *in vitro* per avaluar els efectes tòxics dels contaminants retinguts a les partícules PM₁₀ atmosfèriques, i per l'altre, s'ha establert la contribució dels contaminants químics en aquesta toxicitat, tenint en compte al mateix temps diferents factors que podrien influir en la qualitat de l'aire. S'ha avaluat l'ecotoxicitat amb *Vibrio fischeri* (Microtox) i s'ha completat amb un estudi *in vitro* dels possibles efectes citotòxics (MTT Assay) i genotòxics (Comet Assay) d'aquesta fracció de l'aire en cultius de la línia cel·lular A549. L'anàlisi química de l'aire s'ha centrat en els metalls i PCDD/Fs retinguts a les PM₁₀. Un 20% de les mostres han presentat citotoxicitat. S'ha observat que el test Microtox[®] podria ser una bona eina per fer una primera valoració de la qualitat de l'aire donat que ha correlacionat amb la majoria d'elements analitzats. En canvi, tot i no haver-se observat genotoxicitat en les mostres analitzades, els resultats del Comet Assay han mostrat molt bona correlació amb certs elements carcinogènics.

Per últim, el Capítol VI inclou un resum general dels aspectes més interessants tractats en aquesta tesi, exposant-se les conclusions específiques general.

Abstract

Growth forecasts for the world population in 2015 will be approximately 8000 million people, four times more than in the early twentieth century. This progressive increase in population in recent decades has been associated with an increase in environmental impact. One of the main consequences of human impact has been the contamination of different environmental compartments, such as the atmosphere, hydrosphere and edaphosphere. Because of the interrelationship between these compartments, is important to remember that the impact of them can bring about consequences for the rest. There are many legislative decrees and regulations imposed in order to control the levels of pollutants released into the environment, but rarely quantified the effect that these pollutants can cause to ecosystems. When studying the pollution of an environmental matrix, whether land, air or water, often it is analyzed only a certain number of pollutants depending of the study interest. However, these environmental samples comprising many pollutants as chemical, physical and biological that can affect differently to ecosystems. That is, the analysis of environmental contaminants in a sample can give us guidance on the degree of contamination of that matrix and the possible effect it may cause to the ecosystem, but in order to know the real toxicity of these samples, it is necessary to apply ecotoxicity bioassays with representative organisms of each environmental matrix. Only thus, people can have a more realistic idea of the effect of pollution. That is why the combination of analysis of pollutants with the application of bioassays can make a better diagnosis of the real state of ecosystems.

This thesis shows that the complementation of chemical and ecotoxicological studies is important to make a good environmental assessment in the main environmental compartments of the Earth, such as water, soil, sediment and air. Thus, from the chemical and ecotoxicological diagnosis of different environmental matrices can provide advice and recommendations of sampling, analysis and application of tests to make a good environment diagnosis.

Analyses of metals, metalloids and organic compounds in environmental samples from different compartments were made, and these were supplemented with tests for assessing toxicity. As mentioned, to assess the ecotoxicity of samples from different

environmental matrices, it is interesting to use target organisms adapted to each matrix. In this case, to assess the ecotoxicity of freshwater samples, *Pseudokirschneriella subcapitata* algae was chosen, while to assess the ecotoxicity of organic waste and soil samples it has been selected plants such as *Allium cepa*, *Raphanus sativus* and *Lolium perenne*. Finally, we also used human *in vitro* toxicity tests to evaluate the human toxicity of PM₁₀ particles in the air to lung cells (A549 line from human lung carcinoma). In all cases, it has applied the ecotoxicological test with the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*, in order to assess their suitability in different environmental matrices. This thesis has been divided in four sections corresponding to four different studies in samples of river water and sediment, sewage sludge, soil amended with this waste and air.

Chapter I provides the first introductory paragraph, which talks about ecotoxicology and give a brief description of the characteristics and behavior of pollutants in the environment. Working hypotheses, the general and specific goal of thesis are proposed, and finally, this chapter includes a summary of the basic methodology used in the different chapters of the thesis.

Chapter II presents a study conducted in river water and sediments in eleven Catalan rivers. Passive sampling techniques for contaminants in river water are combined with ecotoxicity bioassays. It has estimated the bioavailable fraction of metals and organic compounds from DGT systems (Diffusive Gradient in Thin Films) and SPMD devices (Semi Permeable Membrane Devices), respectively. It has also analyzed the concentration of metals in sediments. The results of the analysis of contaminants in water and sediments have completed with a battery of ecotoxicity tests with bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri* and the freshwater alga *Pseudokirschneriella subcapitata*. The combination of these techniques in water and sediment allowed to observe the importance of sediment contaminants reservoir in the river water column and as a possible additional source if river conditions vary. The application of ecotoxicity tests in extracts of passive samplers (DGT and SPMD) can determine the potential ecotoxicity of bioavailable fraction of contaminants in water, not observable from ecotoxicity tests with punctual freshwater samples.

Chapter III presents a work focused in an organic waste important for environmental, such as sewage sludge. The management of these wastes is focused on three basic areas: i) the application as organic amendment in agricultural soils, assuming a risk for the soil and groundwater, ii) application as alternative fuel industries, posing a risk to air pollution, iii) the disposal in controlled landfills, assuming a risk for contamination of soil and water. Between 40 and 50% of sewage sludge generated in Europe is just recycling through agricultural land. For this reason, a representative sample of sewage sludge was analysed in order to assess the level of pollutants (metals and organic compounds) toxicity derived from these, and the influence of the treatment from the waste water treatment plants on these parameters. The results showed that the treatment applied to the sludge present little influence in the load of pollutants (except for some PBDEs and phenolic compounds), but instead, it determines an increase of dry matter content, especially nitrogen and organic matter stability. Moreover, the degree of stability of organic matter appeared to be the determining factor in phytotoxicity and ecotoxicity results. Composting, followed by thermal treatment were the most detoxifying methods for these wastes. We conclude that the application of non-routine analyzes (eg total phenolics) in the sewage sludge assessment could be an interesting parameter in predicting the possible phytotoxicity of waste.

Chapter IV focuses on the environmental matrix that serves as support for most of the life organisms on Earth, that is, soil. This chapter includes two works which collect data on the changes in soil fertility, the accumulation of pollutants, the effects on the functioning of C and N cycles, and ecotoxicity and phytotoxicity effects as a result of the application of sewage sludge and composted sludge on agricultural soils. The results showed that the application of organic wastes (sewage sludge and composted sludge) improves the quality and quantity of organic matter and nitrogen content in the soil, but it also increase the content of soluble phenolics and accumulate some metals and organic pollutants (PAHs, PCBs, PBDEs, PCNs). The study also found that the uncontrolled and repetitive application of sewage sludge can cause imbalances in the N and C cycles and cause problems of nitrates contamination in the aquifers. To avoid problems of accumulation of pollutants, groundwater contamination and soil functioning problems, it is recommended applications of anaerobically digested sewage sludge at a dose of 40 Mg ha⁻¹ every two years, in the case of fine texture calcareous soils.

Chapter V is devoted to the air. On one side we have studied the suitability of different *in vitro* tests to evaluate the toxicity of contaminants retained in atmospheric PM₁₀ particles, and on the other, set the contribution of chemical contaminants in this toxicity, considering various factors that could influence in air quality. It has evaluated the ecotoxicity with *Vibrio fischeri* (Microtox[®]) and it has completed with a study of the *in vitro* cytotoxic (MTT Assay) and genotoxic (Comet Assay) effects of this fraction of air in the cell line A549. The chemical analysis of the air has focused on metals and PCDD / Fs retained in PM₁₀. 20% of samples showed cytotoxicity, although pollutant correlation have been very low. It has shown that the Microtox[®] test could be a good tool to make a first assessment of the air quality, and also it has been correlated with most elements analyzed. Although no genotoxicity was observed in samples, Comet Assay results have shown good correlation with certain carcinogenic elements.

Finally, *Chapter VI* includes an overview of the most interesting aspects treated in this thesis, exposing the specific and general conclusions.

CAPÍTOL I
INTRODUCCIÓ, HIPÒTESI, OBJECTIUS I METODOLOGIA

1. INTRODUCCIÓ

1.1 Ecotoxicologia i toxicologia ambiental

Arran de la publicació del llibre ‘Silent Spring’ l’any 1962 per Rachel Carson, l’any 1977, René Truhaut va definir per primera vegada el terme ‘**Ecotoxicologia**’ com ‘la branca de la toxicologia relacionada amb l’estudi dels efectes tòxics, causats per contaminants naturals i sintètics, als constituents dels ecosistemes, animals (incloent humans), vegetals i microorganismes, en un context integrat’ (Truhaut, 1977). Tot i que la definició d’ecotoxicologia hagi anat variant al llarg dels anys, interessa aquesta per la clara integració de l’ésser humà, com animal dins dels ecosistemes; fet que moltes vegades s’oblida entre els experts

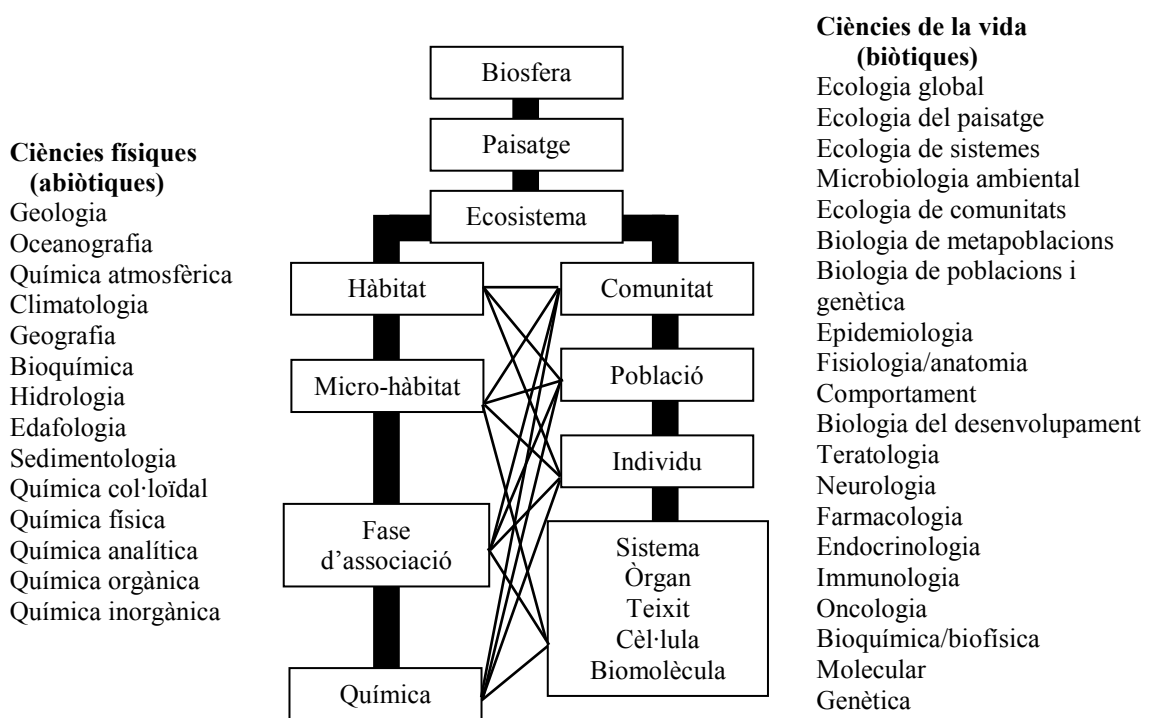


Figura 1. Organització jeràrquica dels camps que aborda l’ecotoxicologia (adaptació de Newman, 2010).

Així doncs, l’**ecotoxicologia** es diferencia de la **toxicologia ambiental**, en que la primera integra els efectes dels contaminants a través de tots els diferents nivells d’organització biològica, mentre que la toxicologia ambiental tendeix a focalitzar més en els efectes dels contaminants ambientals sobre els éssers humans. No obstant,

aquesta distinció segueix sent tema de controvèrsia entre molts experts en ambdós camps.

L'ecotoxicologia és una ciència multidisciplinària que fusiona la toxicologia i l'ecologia, a més d'integrar altres ciències bàsiques com la química o la biologia (Figura 1).

1.2 Conceptes

És interessant conèixer les diferències entre alguns conceptes abans de començar a entrar en matèria. Tot i que contínuament vagin apareixent definicions més complexes en el món científic per al terme tòxic, una manera fàcil i senzilla de definir-lo, seria com a qualsevol substància capaç d'exercir una acció nociva sobre els organismes vius ja siguin d'origen biològic, mineral o sintètic (adaptació de Guitart i Giménez, 2012 i Repetto M. i Repetto G., 2009). Tal i com va citar Paracelsus (1493-1541) considerat el pare de la toxicologia: "Totes les substàncies són tòxiques; és la dosi correcta la que diferencia un verí d'un remei". En el cas que el tòxic sigui d'origen biològic, normalment es parla de **toxina**. En el cas de qualsevol substància, normalment d'origen sintètic, que es trobi dins un organisme però que normalment no s'hi produeixi ni se n'espera la seva presència, es parla de **xenobiòtic**. La definició de contaminant pot tenir molts matisos en funció del punt de vista des del qual es defineixi. En parla anglesa, a diferència del català i el castellà, se'n distingeixen dos mots, "contaminant" i "*pollutant*". Segons la OCDE s'entén per "contaminant" tota substància física, química, biològica, radiològica o matèria que té un efecte advers sobre l'aire, aigua, sòls o la biota. En canvi un "*pollutant*" és una substància que està present en concentracions que pot causar dany als organismes (home, plantes i animals) o que excedeix els estàndards de qualitat. Amb una visió més ecològica de la paraula contaminant, Guitart (2008) ho defineix segons el qual un element o compost supera la capacitat natural de l'ecosistema per transformar-lo o assimilar-lo, de manera que acaba acumulant-se, però no necessàriament ha de ser tòxic o perillós.

Els contaminants que entren en els ecosistemes tant poden ser d'**origen natural** (per exemple les dioxines procedents d'erupcions volcàniques, etc) com d'**origen**

antropogènic (crema de combustibles fòssils, abocaments, etc). Aquests darrers **poden arribar al medi ambient a través de dos vies o focus:**

- a) Focus puntuals: són ocasionats per descàrregues puntuals derivades de l'abocament d'aigües residuals mal tractades, abocadors, vessaments accidentals, emissions atmosfèriques, etc; aquests, en general són episodis normalment fàcils de detectar i de caracteritzar químicament.
- b) Focus difusos: com poden ser l'agricultura i la contaminació de sòls, la deposició atmosfèrica, el trànsit d'àrees urbanes, etc; normalment, fenòmens més difícils de detectar i caracteritzar ja que són mescles molt més complexes de contaminants i sovint els nivells de contaminació són molt més baixos.

1.3 Característiques principals dels contaminants estudiats

En aquesta tesi s'han estudiat tant compostos orgànics com metalls i metal·loides. A continuació es descriuen les principals característiques dels contaminants analitzats en les diferents matrius ambientals. En aquest apartat, es detalla l'estructura química bàsica de cada un dels contaminants, quines són les possibles fonts, distribució en el medi i efectes que causen.

1.3.1 Compostos orgànics

Entre els contaminants orgànics, el grup dels compostos organoclorats és un dels més produïts i que s'han dispersat i distribuït per tot el planeta. Està format per compostos de diferent origen i característiques però que presenten tres propietats importants que fa que es comportin de manera semblant a nivell ambiental (Gribble, 1994;1996): són estables químicament i persistents en el temps; tenen tendència a bioconcentrar-se i biomagnificar-se degut a la seva elevada K_{ow} i per últim, són molt transportables a través de l'atmosfera.

Les **dibenzo-*p*-dioxines policlorades (PCDDs)** comunament denominades dioxines, inclouen un conjunt de 75 congèneres, mentre que els **dibenzofurans policlorats (PCDFs)**, comunament denominats furans, agrupen 135 congèneres, amb diferent nombre i/o posició d'àtoms de clor als anells aromàtics (CE, 2006). El nombre d'àtoms de clor pot variar entre 1 (monoclorodibenzodioxines o furans) i 8 (octaclorodibenzodioxines o furans). La Figura 3 mostra l'estructura química general de les dioxines i furans. Ambdós grups estan classificats com a compostos orgànics persistents (POPs) (Llobet et al., 2008; WHO, 1998) i la seva toxicitat ve determinada pel nombre i posició dels substituents de clor a la molècula de PCDD/Fs.

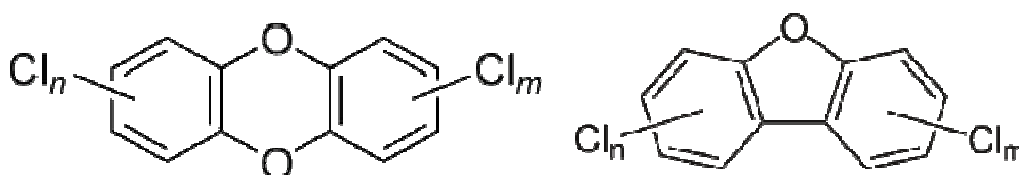


Figura 2. Estructura química genèrica de les PCDDs (esquerre) i PCDFs (dreta)

La font principal d'aquests compostos és la combustió incompleta de combustibles fòssils, processos d'incineració de residus i sobretot, reaccions incontrolades amb productes clorats (Baars et al., 2004; Liem i Theelen, 1997). Les erupcions volcàniques i incendis forestals poden ésser també fonts naturals de dioxines. El fet que es tracti de substàncies molt persistents i semi-volàtils, fa que es puguin transportar a grans distàncies a través del vent ja sigui en forma gasosa o adsorbides a partícules (Lohmann i Jones, 1998). Les PCDD/Fs són extremadament persistents al medi ambient, a més de ser compostos solubles en greixos amb elevada tendència a bioacumular-se i biomagnificar-se en la cadena tròfica (IARC, 1997a; Lorán et al., 2010). Les dioxines provoquen moltes alteracions bioquímiques i tòxiques als animals. Tot i que no està gaire clar el mecanisme d'acció concret, sembla que hom coincideixi en que el seu efecte sobre les cèl·lules rau en la unió dels compostos al receptor de l'aril hidrocarboni (AhR). El cloracné és un dels efectes no carcinògens més importants que causa la intoxicació de dioxines, entre d'altres disfuncions sistèmiques (Bocio et al., 2005; Safe et al., 1998).

Els **bifenils policlorats (PCBs)** estan formats per un grup d'hidrocarburs clorats aromàtics formats per 209 congèneres, dels quals el número i posició dels àtoms de clor

en determina les propietats biològiques i el comportament ambiental de cadascun. A la Figura 2 està representada l'estructura general dels PCBs. Els PCBs són compostos sintètics estables a temperatures elevades (fins a 800°C), no inflamables i amb molt baixa conductivitat elèctrica. Són resistents als àcids, bases i a l'oxidació (Orozco et al., 2003). Gràcies a aquestes característiques, s'han usat àmpliament en diverses aplicacions com a fluids dielèctrics en transformadors, fluids de transferència de calor, fluids hidràulics, olis lubricants, i com a additius en pintures, aïllants, paper de còpia, paper de carbó, adhesius i plàstics. Es consideren compostos d'elevada bioestabilitat, molt lenta biodegradabilitat i per tant, persistents en el medi així com també tenen tendència a acumular-se a teixit adipós (Govarts et al., 2011; Ibarluzea et al., 2011). L'aire és el compartiment ambiental on els PCBs es degraden més fàcilment, bàsicament per mecanismes de fotodegradació (Lin et al., 1995). A l'aigua, s'adsorbeixen a partícules en suspensió (Gouin et al., 2004) i els sòls i sediments actuen com a reservoris (Sinkkonen i Passivirta, 2000).

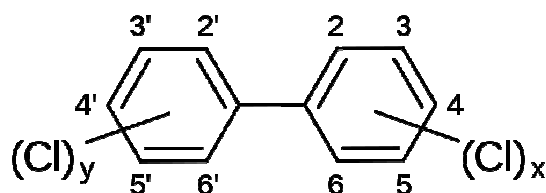


Figura 3. Estructura química general dels PCBs

Tot i que alguns PCBs amb menys de 4 àtoms de clor siguin bastant biodegradables, algunes mescles comercials poden presentar efectes tòxics similars als que provoca la 2,3,7,8-TCDD (Kimbrough, 1995; Safe, 1990). Altres efectes associats a l'exposició de PCBs són disfuncions reproductives, immunosupressió i trastorns en el desenvolupament neuropsicològic (Gilbert, 2003; Goodman et al., 2010; Kimbrough, 1995; Lemesh, 1992; Ribas-Fito et al., 2001; Walkowiak et al., 2001). Tenen la capacitat de poder comportar -se com a dioxines o com anàlegs estrogènics i actuar com a disruptors endocrins. Presenten elevada toxicitat en invertebrats i plantes (Orozco et al., 2003). Estan classificats per la EPA i la IARC com a probables carcinògens en humans (categoria 2A) (IARC, 2012a). L'any 1977 se'n prohibí la seva fabricació i comercialització. Posteriorment, abans del 2011, se'n regulà l'eliminació i descontaminació dels aparells que contenien aquests compostos (BOE, 2006; CE, 1996).

L' **hexaclorobenzè** (HCB) és un fungicida organoclorat utilitzat àmpliament a finals dels anys 40 i fins entrats els anys 70 per evitar que el blat fos atacat pel ‘‘carbó del blat’’ i per tractar els sòls (Reed et al., 2007). La figura 4 mostra la seva estructura química, que consisteix amb un anell de benzè amb 6 clorurs units. Actualment encara s'utilitza en molts països en vies de desenvolupament per la mateixa finalitat. A més a més, l'HCB s'utilitza com a plastificant, additiu de conservants per la fusta i per la cloració de benzens poc clorats (Glynn et al., 2009).

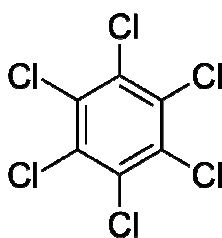


Figura 4. Estructura química de l'HCB

Tot i estar-ne prohibit el seu ús, encara s'emet al medi ambient com a conseqüència de la fabricació de diversos compostos organoclorats com els clorobenzens, tetraclorur de carboni, tricloroetilè, tetracloroetilè, clorur de polivinil i pentaclorofenol. Per aquest motiu, tot i que els nivells detectats en els aliments aparentment hagin disminuït, encara se'n detecta al llarg de la cadena alimentària (Glynn et al., 2009). Com la majoria dels compostos orgànics, s'acumula a teixit adipós. La seva exposició està associada a problemes cutanis, lesions hepàtiques i pulmonars a més a més de símptomes neurològics i immunològics. Té una capacitat inhibidora de la fotosíntesi en algues, efectes depressors en la fertilitat i teratogènics en animals experimentals a més d'haver estat relacionat amb càncer de tiroides (Grimalt et al., 1994). La IARC els ha classificat com a ‘‘possibles carcinògens’’ per humans (grup 2B) (IARC ,2012a).

Els **hexaclorociclohexans** (HCH), es produeixen comercialment per la cloració fotoquímica del benzè. Teòricament, els HCHs presenten vuit estereoisòmers possibles, dels quals, quatre (α -, β -, γ -, i δ -HCH) són els que predominen. L'isòmer γ , conegut comunament com a lindà, és el que presenta propietats insecticides més importants (Manickam et al., 2008; Quintero et al., 2007). En la Figura 5 es representa l'estructura química genèrica dels HCH. Les Nacions Unides al 1999 en restringiren les seves aplicacions, i actualment està prohibit utilitzar els HCHs com a plaguicides pel Conveni

de Ròtterdam. No obstant està permès el seu ús en quantitats molt menors, per a la investigació o tècniques de laboratori.

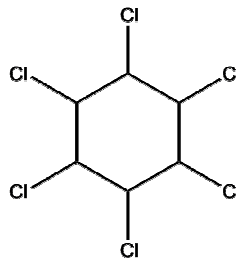


Figura 5. Estructura química genèrica dels hexaclorociclohexans.

Els HCH es poden absorbir per inhalació dels seus aerosols, a través de la pell o per ingestió. Alguns dels seus efectes són problemes de pell, neurològics, hepàtics i reproductors. Es consideren molt tòxics pels organismes aquàtics. Són persistents i tenen capacitat de bioacumular-se en la cadena tròfica, sobretot en ambients aquàtics. Igual que els HCB, la IARC els ha classificat com a “possibles carcinògens pels humans” (IARC, 2012a).

El **pentaclorobenzè (PeCB)** és un compost organoclorat que consisteix en un anell de benzè amb cinc àtoms de clor (Figura 6). El PeCB s’ha utilitzat en el passat com a intermediari en la fabricació de pesticides, particularment el fungicida pentacloronitrobenzè (Van de Plassche et al., 2001). També s’ha utilitzat com a retardant de flama. Multitud de processos industrials que involucren el clor i carbó poden produir PeCB (Bailey 2007; Bailey et al., 2009). També es pot generar en processos de producció de metalls o compostos metàl·lics (Doering et al., 1992; Environment Canada, 2010).

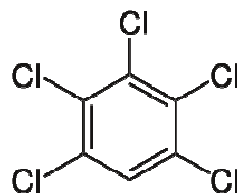


Figura 6. Estructura química del PeCB

Es proposa d’incloure en la Convenció d’Estocolm com a compost orgànic persistent a més d’incloure’l en el protocol de contaminants atmosfèrics amb elevada capacitat de transport (Bailey 2007; Bailey et al., 2009). El PeCB presenta elevada toxicitat pels

organismes aquàtics, però a més, la combustió de PeCBs pot generar fums corrosius molt tòxics a més de PCDD/Fs (Environment Canada, 2010).

Els **naftalens policlorats** (PCNs) estan formats per una família de 75 congèneres formats per un naftalè al qual hi ha units d' un a vuit àtoms de clor. A la figura 7 es mostra l'exemple de l'estructura química del 2,3,6,7- tetracloronaftalè. Les seves propietats fisicoquímiques són molt semblants a les dels PCBs, a més de ser utilitzat quasi bé per les mateixes aplicacions: fluïts dielèctrics, retardants de flama, a la indústria de l'automòbil, ceres i protectors de la fusta, etc. (Bidleman et al., 2010; Rotander et al., 2012). Són compostos lipòfils, volàtils, molt poc solubles en aigua i molt solubles en dissolvents orgànics. La seva font principal, sobretot a l' hivern, són els processos tèrmics. Les principals fonts d'emissió ambiental són la incineració de residus i l'abocament directe al medi dels productes que en contenen (Takasuga et al., 2004).

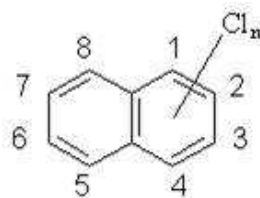


Figura 7. Estructura química genèrica dels PCNs

La seva toxicitat ve donada per l'acció amb el receptor de l'aril hidrocarboni (AhR) (Blankenship et al., 2000). Igual que els altres COPs, els PCNs es troben distribuïts globalment. S'han trobat en aire, sòls, sediments de rius i llacs, teixits i sang animal, teixit adipós i llet materna en humans (Bidleman et al., 2010; Jansson et al., 1984; Williams et al., 1993.). Són compostos amb elevada capacitat de bioacumulació i biomagnificació.

El **DDT** es refereix a l'isòmer **4,4'-DDT (1,1'-(2,2,2-tricloretilèndie)-bis-(4-clorobenzè)** o més abreujadament dicloro-difenil-tricloroetà) (C₁₄H₉Cl₅), que és també el compost predominant del producte tècnic. A la Figura 8 es representen les estructures del DDT i els seus derivats, el dicloro-difenil-dicloroetilè (DDE) i el dicloro-difenil-dicloroetà (DDD). El DDT s'introduí com a insecticida durant la Segona Guerra Mundial per tal de combatre els vectors de greus malalties com el tifus o la malària (Purnomo et al., 2011). El DDT revolucionà el món de l'agricultura a finals dels anys 40 i a partir dels anys 50 també fou utilitzat en el món de la ramaderia. A l' inici dels anys 70 sorgiren les primeres regulacions i prohibicions imposades per Amèrica del Nord i

Europa, degut a la seva persistència tant en el medi aquàtic, com aliments làctics i carnis, degut a la seva capacitat de bioacumulació i a la resistència que començaven a mostrar alguns insectes després de moltes aplicacions (Carson, 1962). Actualment el seu ús està restringit a problemes de salut pública com la prevenció de la malària.

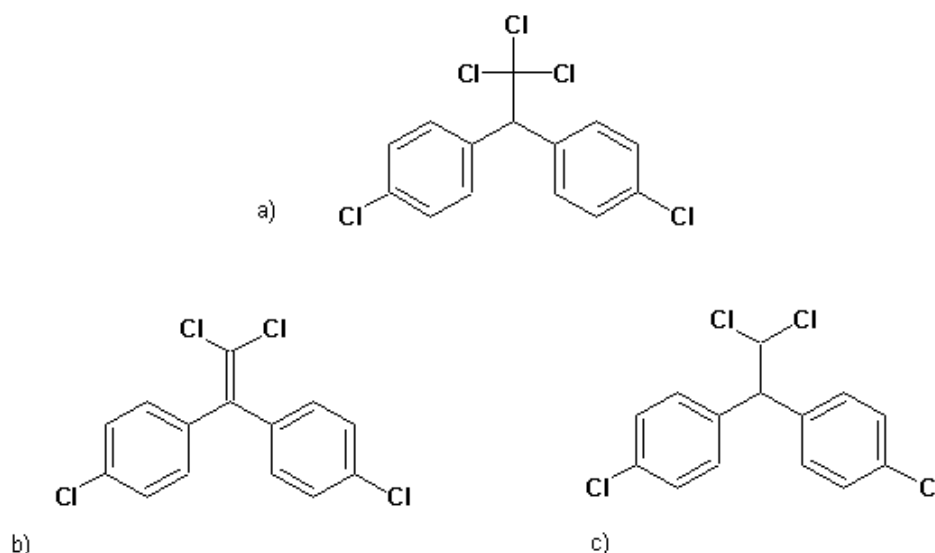


Figura 8. Estructura química del a) DDT, b) DDE i c) DDD

El DDT i els seus metabòlits són fàcilment i ràpidament assimilables pels organismes gràcies a la seva elevada solubilitat en lípids i baixa solubilitat en aigua, de manera que queden retinguts a teixit adipós de manera molt estable. A més a més, la seva estabilitat també ha permès que es quedi intacte durant anys en els sòls i sediments, podent ser així una font d'exposició a llarg termini pels organismes (Foght et al., 2001). Els possibles efectes del DDT als organismes inclouen problemes de reproducció i desenvolupament, possibles efectes en el sistema immunitari a més de produir-se taxes elevades de mortalitat en aus després d'haver-se ruixat camps amb DDT. A més a més, com molts compostos organoclorats, el DDT es considera un agent neurotòxic (Gautam i Suresh, 2007; Turusov et al., 2002). Està classificat per la IARC com a "possible carcinogen per humans" (grup 2B) (IARC, 2012a).

L'**endosulfà** és un insecticida i acaricida organoclorat del grup dels ciclodien present al mercat des dels anys 50 (Becker et al., 2011). A més d'insecticida, en alguns països també s'utilitzà com a conservador de fustes (Exttoxnet, 1998). A la Figura 9 es mostra l'estructura química d'aquest compost. L'endosulfà s'ha descrit com un compost tòxic, persistent, bioacumulable i amb elevat potencial de transport pel Conveni d'Estocolm

(POPRC, 2008). És molt volàtil, de manera que es dispersa molt bé per l'aire, ja sigui en forma de gas o de partícules associades que posteriorment precipitaran amb la pluja o la neu, arribant així a la resta de sòls i aigües. Degut a les seves característiques, és un contaminant ambiental ubic present en molts compartiments ambientals que s'ha detectat en atmosfera, aigua, gel, sòls, vegetació i altres ecosistemes d'àrees remotes del planeta (Becker et al., 2011; Weber et al., 2010).

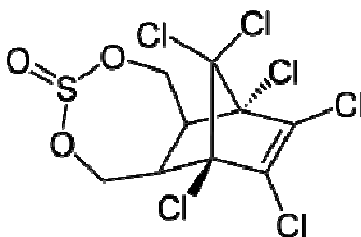


Figura 9. Estructura química de l'endosulfà

Es considera un producte molt tòxic per a tot tipus d'organismes. Està considerat com a disruptor endocrí, hepatotòxic, genotòxic i neurotòxic (Sharma et al., 2012). La EPA l'ha classificat d'alta toxicitat aguda, mentre que la OMS el classifica com a moderadament perillós (Turlough et al., 1992; US EPA, 2002a).

Els **compostos orgànics perfluorats** (PFAS) són substàncies orgàniques alifàtiques i lineals on els àtoms d'hidrogen han estat substituïts per àtoms de fluor (Fromme et al., 2009). Estan formats per àtoms de carboni, fluor i/o sulfur (Butt et al., 2010). Tot i que el grup dels PFAS el formen centenars de compostos dividits en diverses categories, els que ens interessen en aquesta tesi són els subconjunts (per)fluorats orgànics surfactants i els polímers orgànics fluorats com el **sulfonat de perfluorooctà (PFOS)** i l'**àcid perfluorooctanoic (PFOA)** representats a la Figura 10.

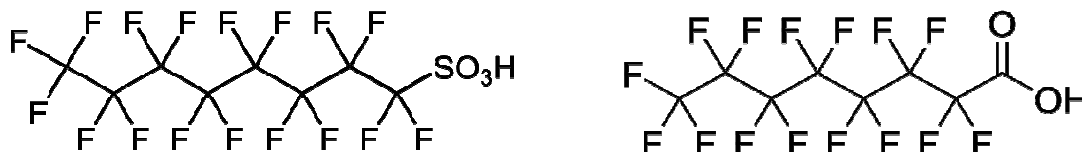


Figura 10. Estructura química del PFOS (a) i PFOA (b)

Ambdós tenen característiques tensioactives, per la qual cosa els fan bons candidats en ser utilitzats com a surfactants (UNEP, 2006). Són utilitzats en substàncies d'aïllament, retardants de flama, lubricants (Zhao et al., 2012) i d'altres productes de consum (Boulangier et al., 2005). Són generalment hidrofòbics però alhora lipofòbics, per la qual cosa no s'acumularan a teixit adipós com la resta de compostos orgànics. Els PFOS i PFOA són persistents en el medi i tenen capacitat de bioacumular-se i biomagnificar-se en la cadena tròfica (Butt et al., 2010; CESE, 2006;).

Els **difenil èters polibromats** (PBDEs) inclouen 209 congèneres diferents, en funció del nombre i posició d'àtoms de brom; la Figura 11 en mostra l'estructura química general. Els PBDEs són un grup de compostos aromàtics, persistents al medi, halogenats, molt resistents a la degradació, bioacumulables i biomagnificables, amb potencial toxicitat per als humans. Són lipòfils i molt poc solubles en aigua (Verner et al., 2011).

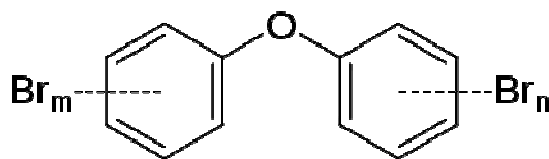


Figura 11. Estructura química general dels PBDEs

Principalment s'han utilitzat des dels anys 70 com a retardants de flama en diferents productes de consum elèctrics i electrònics, material de construcció i tèxtil i la seva alliberació al medi es produeix principalment per la incineració de productes que en contenen (Verner et al., 2011; WHO, 1997;). Els PBDEs es consideren anàlegs químics de les hormones tiroïdals, per la qual cosa poden actuar com a disruptors endocrins i provocar diverses disfuncions hormonals als organismes (Messer, 2010). La IARC classifica els PBDEs dins el grup 2B (possible cancerigen en humans) (IARC, 2012a).

Els **hidrocarburs aromàtics policíclics** (PAHs) són una família de contaminants formats per la unió de dos o més anells aromàtics produïts tant per causes naturals com antropogèniques (Ortiz et al., 2012). No contenen substituents ni heteroàtoms. Existeixen més de cent compostos químics diferents, entre els quals alguns d'ells són mutagènics, carcinògens i/o teratògens. En augmentar el nombre d'anells (Pes molecular) augmenta la lipofília (K_{ow}), la persistència, la bioacumulabilitat i la toxicitat

(US EPA, 2002b). A la Figura 12 es representa l'estructura química d'alguns d'aquests compostos.

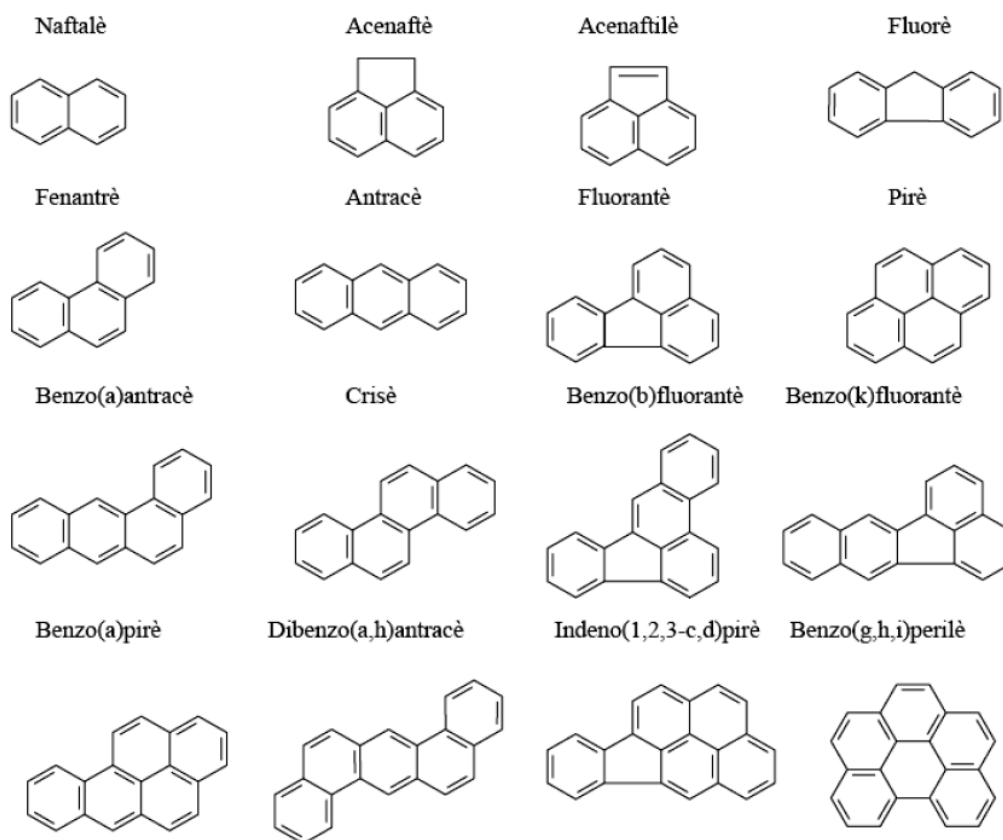


Figura 12. Estructura química d'alguns PAHs.

Es formen durant la combustió incompleta de materials orgànics com el carbó, la fusta, el petroli i la gasolina, les escombraries i altres substàncies orgàniques com el tabac o la carn preparada a la brasa (Ortiz et al., 2012; Tobiszewski i Namieśnik, 2012). Són compostos sòlids en condicions ambientals, amb punts de fusió superiors a 100°C (excepte els menors de la sèrie, naftalè i acenaftè). Són molt poc solubles en aigua, molt solubles en dissolvents orgànics apolars el que els fa tenir molta capacitat bioacumulativa. El grup de compostos amb major toxicitat és el grup del benzopirè (Orozco et al., 2003). Són contaminants ambientals ubics, detectats entre d'altres matrius en aire, aigua, aliments i sòls (Ortiz et al., 2012; Tobiszewski i Namieśnik, 2012). Estan considerats com a COPs pel Conveni d'Estocolm i la IARC va establir com a probables carcinògens humans (grup 2B), alguns PAHs com: benzo[b]fluorantè, benzo[j]fluorantè, benzo[k]fluorantè o el benzo[c]phenantrè. El benzo[a]pirè es

considera, segons la IARC, carcinogen per humans (grup 1) (IARC, 2012a) i fins i tot s'utilitza com a patró positiu en alguns tests de genotoxicitat (Klamer et al., 1997).

Els **nonilfenols** (NP) són substàncies de síntesi utilitzades principalment en la fabricació de productes de neteja com els detergents, i en menor mesura, per altres aplicacions com per exemple, pesticides o resines (Lapworth et al., 2012). Les seves aplicacions estan molt relacionades a les seves propietats surfactants. La majoria de NP presents a l'ambient, són producte de la degradació biològica i fisicoquímica dels nonilfenols polietoxilats (NPEO) (Krupiński i Długoński, 2011). A la Figura 13 es representa l'estructura química bàsica d'uns i altres compostos.

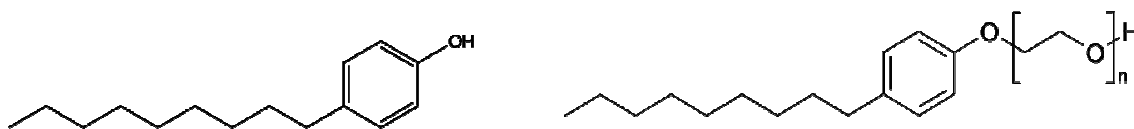


Figura 13. Estructura química del 4-nonilfenol (a) i el nonilfenol etoxilat (b)

Degut a les seves aplicacions, és comú trobar-ne concentracions elevades en aigües residuals (Rabouan et al., 2012). Són tòxics per organismes aquàtics, la seva degradació és lenta i tendeixen a acumular-se, degut a l'elevada lipofília, en fangs, sòls, sediments i organismes (Soares et al., 2008). Es consideren disruptors endocrins degut a la seva semblança estructural amb els estrògens (17 β -estradiol) de manera que poden provocar problemes reproductius i de desenvolupament com feminització i disminució de la fertilitat (Rabouan et al., 2012).

1.3.2 Metalls i metal·loides

Tot i que alguns metalls siguin elements essencials per a molts organismes, la majoria d'ells són tòxics a baixes dosis d'exposició i tendeixen a acumular-se. En el medi no acostumen a estar en estat elemental pur sinó que es troben principalment formant compostos, ions o complexes (Newman, 2010). Arriben al medi tant per fonts naturals com antropogèniques i són extensament utilitzats en la indústria.

L' **antimoni (Sb)** és un element semi-metàl·lic que es comporta químicament com un no metall. S'allibera al medi ambient tant per fonts naturals com antropogèniques. Les principals fonts antropogèniques són activitats mineres i emissions industrials, combustió de combustibles fòssils i incineració de residus. S'utilitza sobretot en aliatges metàl·lics i alguns dels seus compostos són utilitzats com a ignífugs en pintures, ceràmiques, esmalts, vulcanització del cautxú i focs artificials. També s'utilitza molt com aliatge per augmentar la duresa i la força del plom (He et al., 2012). Té la capacitat de mantenir-se en l'aire, adherit a partícules molt petites durant molts dies (US EPA, 2004). La majoria d'estrónci de l'aire és dipositat al sòl, on s'hi adhereix formant partícules que contenen ferro, manganès o alumini. Segons l'ATSDR (2011a), afecta el sistema cardiovascular i respiratori però no està classificat com a cancerigen.

L' **arsènic (As)** està classificat com a metal·loide ja que presenta propietats de metall i no metall alhora. La seva presència en els sòls i aigües pot ser deguda tant a causes naturals com antropogèniques (Bundschuh et al., 2012). Una de les entrades principals d'aquest element als sòls per via antropogènica, ha estat la utilització de fertilitzants i pesticides (Basu et al., 2001). La seva presència en l'atmosfera, es pot donar principalment per la combustió de carbó i fusta, la mineria, forns de metalls i incineració de residus (Bundschuh et al., 2012). L'As mostra una gran afinitat per a la matèria orgànica, de manera que pot ser un problema en sòls molt rics en matèria orgànica. La forma tòxica de l'arsènic és la del catió trivalent As^{3+} , que es caracteritza per a ser bastant soluble en aigua. Les formes inorgàniques (As_2O_3 , As_2O_5 , AsH_3) de l'arsènic són, generalment, molt més tòxiques que la forma orgànica (Rahman et al., 2012). Està considerat per la IARC dins el Grup 1 (IARC, 2012a; 2012b).

El **cadmi (Cd)** és un metall blanc-blavós, relativament poc abundant a l'escorça terrestre. La major part del cadmi d'origen antropogènic present al medi ambient es deu a la indústria del plom i del zinc, a la incineració de residus, la crema de combustibles fòssils i d' altres activitats mineres. Per la seva excel·lent resistència a la corrosió, s'utilitza en el xapat de platí, ferro, coure, llautó i altres aliatges. Altres usos del cadmi inclouen soldadures, parts elèctriques, pigments, plàstics, cautxú, pesticides, galvanitzats o manufacturació d'aeronaus (ATSDR, 2011b; Gallego et al., 2012). El cadmi es troba àmpliament distribuït en diversos aliments, tant animals com vegetals, a l'aigua i l'aire de l'ambient (Gallego et al., 2012). El cadmi s'acumula en gran facilitat

en les plantes i animals. En el cas dels mamífers, si tenen una dieta pobre en calci, aquest encara s'absorbeix més. Una vegada absorbit, s'associa a les proteïnes de baix pes molecular, metal·lotioneïna, i s'acumula en ronyons, fetge i òrgans reproductors (té un temps de vida mitja de 10 anys). La IARC ha considerat aquest element com a cancerigen per a humans (Grup 1) (IARC, 2012a).

El **cobalt (Co)** és un element que es troba de forma natural en roques, sòls, aigua, plantes i animals. És un metall dur, ferromagnètic de color blanc-blavós. S'utilitza principalment en la manufacturació de motors d'avions, imans, estris tallants i en pròtesis de genoll i maluc. La seva alliberació a l'atmosfera es pot donar per fonts naturals o fonts antropogèniques com la crema de carbó, petroli, etc. (WHO, 2006). Se n'ha detectat en moltes matrius incloent aire, aigües superficials, aigües residuals, aigua subterrània, sòls i sediments (WHO, 2006). No obstant, tot i que en petites quantitats sigui un element essencial per als mamífers, la IARC ha determinat que el cobalt i els seus compostos són possibles carcinògens en humans. Segons l'ATSDR (2011c) provoca efectes a nivell cardiovascular, hematològic i respiratori a més d'alteracions en el desenvolupament.

El **coure (Cu)** és un element que es troba de forma natural en roques, sòls, aigua i aire, a més de ser essencial per als éssers vius (Budavari, 1996). Tanmateix, la indústria elèctrica i electrònica, metal·lúrgica, els combustibles fòssils i l'agricultura han estat i són una font important de coure antropogènic al medi ambient. S'ha utilitzat en la fabricació de molts productes així com també d'algicides (Padovesi-Fonseca i Philomeno, 2004). El coure té tendència a adherir-se als òxids de manganès i a les argiles. A més a més, té molta afinitat per les partícules sòlides en suspensió, fet que fa que s'incorpori ràpidament al sediment (TOXNET, 2012). Tot i ser un element essencial, a elevades concentracions pot ser tòxic per als éssers vius. La IARC ha determinat que el coure no és classificable en quant a carcinogen pels éssers humans (IARC, 2012a).

El **crom (Cr)** és un metall de transició dur, fràgil, gris acerat i brillant. És molt resistent a la corrosió. El crom és un element natural, present en les roques, sòls i mar, tot i que està àmpliament estès en la indústria. Les principals fonts antropogèniques de crom al medi ambient són l'elaboració de pigments, bateries, fungicides, adobats de pells,

papereres, indústries químiques, tèxtils i metal·lúrgiques (Mackison et al., 1981). El crom generalment es presenta en dos estats d'oxidació: crom hexavalent Cr (VI) i crom trivalent Cr (III). Les espècies de Cr (VI) estan considerades tòxiques i carcinògenes, causants de possibles desordres hepàtics, pulmonars i digestius, mentre que el Cr (III) és menys tòxic. El crom en condicions naturals es troba quasi sempre en forma trivalent i té tendència a precipitar i incorporar-se en sediments, mentre que el crom d'origen antropogènic, normalment es troba en forma hexavalent amb capacitat de formar oxianions molt solubles (Barrera-Díaz et al., 2012). El Cr (VI) ha estat classificat per la IARC com a carcinogen per humans (Grup 1) (IARC, 2012a).

L'**estany (Sn)** és un metall insoluble que es pot trobar com a compost orgànic o inorgànic. Els compostos orgànics són més bioacumulables que la forma inorgànica. Es troba en el llautó, el bronze i en alguns materials per a soldar. L'estany metàl·lic s'usa per revestir llaunes d'aliments, begudes i aerosols. Els compostos inorgànics s'usen en alguns productes de cura personal a més d'utilitzar-se com additius per a aliments i colorants. Els compostos orgànics es fan servir en la fabricació de plàstics, envasos per a aliments, canonades plàstiques, plaguicides, pintures i repel·lents d'animals. La seva alliberació al medi ambient pot ser degut a processos naturals i a activitats antropogèniques com la mineria, la combustió de petroli i carbó i la producció i ús de compostos d'estany (ATSDR, 2011e ; Schwartz, 2002). La IARC no ha classificat la carcinogenicitat de l'estany metàl·lic ni els seus compostos inorgànics (IARC, 2012a).

El **manganès (Mn)** és un metall de transició blanc grisenc, dur, molt fràgil, refractari i fàcilment mal·leable. El manganès es pot trobar de forma natural (normalment en forma d'òxids) en sòl, aire, aigua i aliments, però també n'és una font important l'activitat industrial humana, com les plantes de producció de ciment, centrals elèctriques, la incineració de residus o la combustió de fuels fòssils (Sittig, 2002; USEPA 2007a). Tot i ser un element essencial en humans, l'exposició prolongada a aquest element pot causar efectes al sistema nerviós i respiratori (Josephs et al., 2005). A més a més, el permanganat potàssic (KMnO_4) és molt corrosiu. El manganès no ha estat classificat com a metall cancerigen per a la IARC (2012a).

El **mercuri (Hg)** és un metall normalment líquid a temperatura ambient. Les fonts principals de mercuri antropogènic en el medi ambient són la crema de combustibles

fòssil, fonamentalment carbó. La incineració de residus també n'és responsable en menor proporció i la indústria de zinc i plom en una petita part. A nivell de contaminacions locals, la indústria clor-alcali ha estat en el passat un vector d'emissions de mercuri a les seves rodalies. Altres fonts de mercuri al medi ambient, poden ser els pesticides, compostos farmacèutics, pintures, catàlisis, bateries alcalines, llums, mineria d'or, amalgames dentals, etc. (Rallo et al., 2012; Wang et al., 2012). El mercuri, tendeix a adsorbir-se a la matèria orgànica, de manera que sovint és un problema en sòls rics en matèria orgànica (Wang et al., 2012). El mercuri elemental és relativament inactiu, però el mercuri dipositat, sovint pot ser transformat pels microorganismes del sòl a una forma més tòxica anomenada metil mercuri (MeHg) (Wang et al., 2012). Tot i que la toxicitat del mercuri vingui donada per la forma en que es trobi, en són comuns els efectes neurotòxics que produeix la seva exposició. També s'han descrit efectes en el desenvolupament, gastrointestinals, oculars i renals (ATSDR, 2011d; Rallo et al., 2012). La IARC ha classificat el mercuri inorgànic i els seus compostos dins el grup 3, no considerats com a carcinògens en humans, mentre que el metil mercuri estaria dins el grup 2B com a possibles carcinògens en humans (IARC, 2012a).

El **molibdè (Mo)** és un metall de transició. A la natura es troba sempre en forma de mineral i mai es trobarà de forma lliure. En petites quantitats, s'utilitza en diferents aliatges d'acer per a endurir-lo o fer-lo més resistent a la corrosió. Altres aplicacions del molibdè són com a catalitzador en la indústria petrolera, s'utilitza en diferents pigments, com a lubricant o en diferents aplicacions electròniques (Haynes, 2012; TOXNET, 2012). El molibdè es troba en concentracions importants en l'aigua de mar, en forma de molibdats (MoO_4^{2-}), forma en que els éssers vius poden absorbir-lo fàcilment. És un metall essencial des del punt de vista biològic ja que es troba formant part d'alguns enzims cel·lulars. No ha estat classificat com a metall cancerigen per a la IARC (2012a).

El **níquel (Ni)** és un metall de transició de color blanc platejat, conductor de l'electricitat i de la calor, és dúctil i mal·leable pel que es pot laminar, polir i forjar fàcilment, i presenta cert ferromagnetisme. Es troba en diferents minerals i en tots els sòls, ja sigui per causes naturals o antropogèniques (Iyaka, 2011). Tot i que estigui considerat com element essencial per l'home, la principal font de níquel antropogènica, és la indústria, incloent la fabricació d'acer, aliatges i el galvanitzat. També s'utilitza en la fabricació de ferro colat, productes químics, bateries, ceràmiques o com a catalitzador industrial.

Una font important de níquel en les aigües, és l'aportació d'aigües residuals industrials (Budavari, 1996; TOXNET, 2012). El níquel està present al medi ambient majoritàriament en formes solubles. Pot formar complexos estables amb molts lligants orgànics. El níquel en concentracions elevades, és tòxic. Els compostos de níquel han estat classificats per la IARC dins el grup 1 (IARC, 2012a).

El **plom (Pb)** és un dels metalls més extensos arreu del món. La principal causa de Pb atmosfèric durant anys fou la utilització de gasolines amb plom, actualment prohibides. Altres fonts importants de Pb són la indústria metal·lúrgica (fonderies de plom), la mineria, la crema de carbó i/o materials que continguin plom, refinaria de ferralla, utilització en la fabricació de pigments, recobriments, recipients, unguents i piles elèctriques (Bird, 2011; Zhang et al., 2012). La contaminació dels sòls i les aigües per Pb, pot venir principalment de les deposicions d'aquest plom atmosfèric. El plom és relativament poc insoluble en l'aigua, de manera que una vegada dipositat en forma de sals o òxids insolubles, queda relativament enretirat del cicle de l'aigua, i per tant, d'una possible incorporació als organismes per aquesta via (TOXNET, 2012). La toxicitat del Pb ve donada per la seva capacitat neurotòxica, a més d'afectar els sistemes hematopoètic, esquelètic, immunitari, endocrí i renal (Zhang et al., 2012). La IARC l'ha classificat com a possible carcinogen en humans (Grup 2B) (IARC, 2012a).

El **tal·li (Tl)** es troba de forma natural a l'escorça terrestre (Cvjetko, 2010). És molt utilitzat en la fabricació d'aparells electrònics, interruptors i terminals, principalment en la indústria dels semiconductors (Peter i Viraraghavan, 2005). S'allibera a l'atmosfera principalment per la crema de carbó i des de fonderies (ATSDR, 2011f). Pot romandre molt de temps sense degradar-se en aire, aigua i sòl. Alguns compostos de Tl són eliminats de l'atmosfera per la pluja o la neu de manera que es diposita als sòls, és absorbit per les plantes i així entra a la cadena tròfica. Presenta la capacitat de bioacumular-se (Xiao et al., 2012). És un element d'elevada toxicitat, que s'acumula en el sistema ossi, renal i eventualment al sistema nerviós (Peter i Viraraghavan, 2005). Degut a la manca de dades d'experimentació animal, epidemiològiques, mutagèniques i genotòxiques, la Comissió per a les Comunitats Europees no ha pogut classificar-lo respecte la seva carcinogenicitat (potencial) (Cvjetko, 2010).

El **vanadi (V)** es pot trobar de forma natural a l'escorça terrestre i en les roques, en certs minerals de ferro i en dipòsits de petroli cru. En la indústria s'utilitza principalment en aliatges amb ferro, molibdè, alumini i per formar part del bronze i el llautó. També s'utilitza en ceràmica, insecticides, tincions, revelat fotogràfic, televisors de color, etc (Moskalyk i Alfantazi, 2003). Tot i haver-se observat *in vitro* i *in vivo* efectes mutagènics i genotòxics en cèl·lules de mamífer (Rodríguez-Mercado i Altamirano-Lozano, 2006), el Vd no s'ha inclòs dins la llista d'elements carcinògens per la EPA. A més a més, pot provocar efectes a nivell cardiovascular, gastrointestinal, renal, reproductiu i respiratori (Moskalyk i Alfantazi, 2003; ATSDR, 2011g). Sí que s'ha inclòs dins el grup 2B com a possible carcinogen el pentòxid de vanadi, segons la IARC (IARC, 2012a).

El **zinc (Zn)** és un dels elements més comuns a l'escorça terrestre, essencial per molts aspectes del metabolisme (King, 2011). Les fonts antropogèniques de zinc són principalment processos de galvanització, la indústria metal·lúrgica, papereres, vitroceràmica, tèxtil, indústria química i farmacèutica. A més, també s'utilitza com insecticida (Naito et al., 2010; TOXNET, 2012). El zinc es troba en l'aire, el sòl i l'aigua i és present en tots els aliments. El zinc a les aigües superficials es troba en forma inorgànica, iònica o col·loïdal. Els seus compostos són poc solubles i tenen capacitat d'adsorbir-se fortament als sediments. La majoria de mineral de Zn que es troba al medi ambient està en forma de sulfur del zinc (TOXNET, 2012). No està classificat per la seva carcinogenicitat (potencial) però pot causar efectes a nivell gastrointestinal, hematològic i respiratori (ATSDR, 2011h).

1.4 Dinàmica dels contaminants en el medi

Un cop s'han presentat les principals característiques de les diferents famílies de contaminants és convenient conèixer quin dany potencial poden causar al ser alliberats al medi. El dany potencial no s'hauria d'avaluar només amb dades teòriques dels efectes tòxics sobre organismes i ecosistemes sinó també en base a la seva exposició potencial, sovint correlacionada amb la concentració ambiental. Fins i tot es podria arribar a assumir que si d'un contaminant no hi ha d'haver exposició no caldria disposar de dades

toxicològiques d'aquest (Vighi i Calamari, 1993). Per exemple, els compostos més perillosos pel medi ambient global, no tenen perquè ser precisament els més tòxics, sinó que ho són aquells als quals els organismes estan més exposats degut a la seva persistència i bioacumulació potencial. Per a conèixer la possible exposició a un determinat contaminant, és molt necessari conèixer-ne la seva dinàmica en el medi. La dinàmica de contaminants (Figura 14) pretén estudiar el transport i distribució d'una substància en les diferents matrius ambientals o biota i els canvis que pateix al llarg del temps (en concentració, forma química, etc), incloent també les transformacions que pugui patir, tant biòtiques com abiòtiques (TGD, 2003). En última instància, ajuda a l'anàlisi de risc.

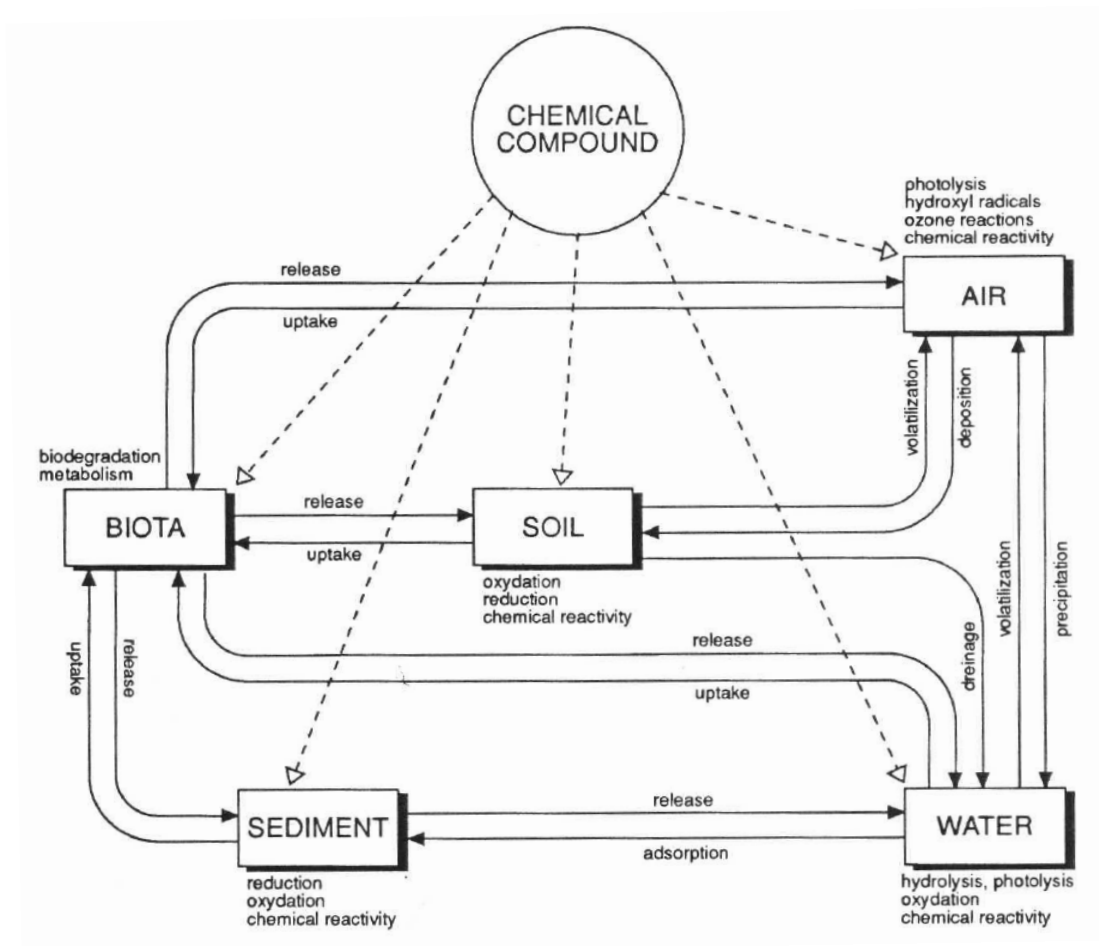


Figura 14. Esquema dels principals processos de transport i transformació dels compostos químics en els diferents compartiments ambientals (adaptació de Vighi i Calamari, 1993)

Quan un contaminant és emès al medi (atmosfera, aigües o sòls) aquest evolucionarà d'una forma o altra depenent de les característiques intrínseques del contaminant i de les característiques del medi on s'allibera; la combinació de les quals en determinarà la persistència, la mobilitat o transferència i la transformació. Cal tenir en compte que les matrius ambientals (aire, aigua i sòls/sediments) tenen característiques molt diferents i en cadascuna d'elles els contaminants tenen un comportament molt diferent.

Pel que fa a les **proprietats del contaminant** més determinants en la dinàmica són:

- La **solubilitat en aigua (S) o producte de solubilitat (K_s)**: aquesta és una de les propietats més significatives que afecta al transport de contaminants en el medi. Els contaminants més solubles tendeixen a ser dispersats pel cicle hidrològic, tenen coeficients d'adsorció baixos i si són orgànics s'acostumen a acumular poc en organismes aquàtics a més de ser fàcilment degradables per microorganismes (Lyman, 1982). En plantes tant els compostos orgànics com inorgànics molt solubles poden acumular-s'hi.
- La **constant de repartiment octanol-aigua (K_{ow})**, és un bon indicador del potencial de bioacumulació d'un compost orgànic al teixit adipós d'animals, parts lipòfiles de plantes i també de l'adsorció potencial a la matèria orgànica del sòl (Boulding, 1995).
- La **pressió de vapor i la constant de Henry (H)** indiquen la volatilitat i afinitat per l'atmosfera d'un compost. Pel que fa a la volatilització en humit (en el medi generalment hi ha presència d'aigua), la volatilitat ve controlada per la solubilitat en aigua, pes molecular i pressió de vapor i de la naturalesa de la interfase aigua-aire (Samiullah, 1990).
- **Constant de dissociació (K_a)**, mostra la força que tenen algunes molècules per dissociar-se. Coneixent aquesta constant, juntament amb el pH del medi es pot predir si el contaminant es trobarà en forma molecular o ionitzat.
- Les **constants de distribució (K_d) i de repartiment amb el carboni orgànic (K_{oc})** fan referència a l'adsorció de contaminants a les partícules del sòl o a la

matèria orgànica d'aquest respectivament. No és una propietat estrictament intrínseca del contaminant ja que depèn del sòl/sediment en que s'hagi efectuat l'assaig.

- **Temps de vida mitjana ($t_{1/2}$)**, dóna idea de la persistència d'un contaminant. És el temps que ha de transcórrer per a que la concentració inicial d'un contaminant orgànic es degradi un 50% per via biòtica o abiòtica. Propietat que depèn del medi on s'hagi fet l'experiment i per tant s'ha d'indicar.
- Altres paràmetres d'interès són **l'estructura química, pes molecular, estat físic, reactivitat, constant de complexació**, etc.

A la Taula 1 es mostren els principals paràmetres i rang de valors que determinen l'afinitat d'un contaminant per una matriu ambiental determinada.

Taula 1. Tipus d'afinitat dels compostos orgànics pels diferents compartiments ambientals en relació a les característiques fisicoquímiques de la substància.

Afinitat	Aire H Pa m ³ mol ⁻¹	Aigua S g l ⁻¹	Sòl K _{oc}	Biota K _{ow}
Baixa	< 10 ⁻³	< 10 ⁻³	< 1	< 10 ⁻³
Mitjana	10 ⁻³ - 1	10 ⁻³ - 1	1 - 10 ³	10 ³ - 10 ⁵
Alta	> 1	> 1	> 10 ³	10 ⁵

H: constant de Henry; S: solubilitat en aigua; K_{oc} constant de repartiment amb el carboni orgànic del sòl; K_{ow}: constant de repartiment octanol:aigua (Vighi i Calamari, 1993)

Les **característiques del medi** que més influeixen en la dinàmica de contaminants es poden resumir per a cada matriu ambiental de la següent manera (Klein, 1989):

- **Aire:** són la temperatura, la direcció dels vents preferencials, pressió atmosfèrica i el tipus i mida del material particulat en suspensió. La persistència de contaminants a l'aire acostuma a ser baixa, aquests però poden transportar-se a indrets llunyans tant en fase gasosa com units a partícules i tendeixen a sedimentar per deposició seca i/o humida. Els processos de transformació principals són la hidròlisi, oxidació, fotòlisi, etc..

- **Aigua:** les característiques del sediment, sòlids en suspensió, carboni orgànic dissolt, temperatura, pH, potencial redox i capacitat tampó, etc. La persistència de contaminants a l'aigua depèn de la taxa de renovació del medi concret. Els contaminants poden volatilitzar-se, sedimentar i acumular-se a la biota. Els processos de transformació més comuns són la biodegradació, l'oxidació-reducció, la hidròlisi, la fotòlisi, etc..
- **Sòls i sediments:** la quantitat i qualitat de la matèria orgànica, la textura, porositat, tipus i quantitat d'argiles, pH, conductivitat elèctrica, capacitat d'intercanvi catiònic, potencial redox, temperatura i humitat, biomassa, etc. Els contaminants acostumen a tenir-hi elevada persistència, encara que es poden mobilitzar cap a les aigües o aire. Els processos de transformació biològica són molt importants gràcies a l'elevada activitat microbiana d'aquest medi. També es poden donar processos de complexació, hidròlisi, oxidació-reducció, foto degradació (en superfície), polimerització, etc

Tal i com es pot veure a la Figura 14, en totes les matrius ambientals existeix la possibilitat de transferència de contaminants cap als organismes presents al medi donant lloc a processos de bioacumulació. La bioacumulació d'un contaminant, és la conseqüència neta dels processos d'entrada, biotransformació i eliminació del contaminant a través d'un individu (Newman, 2010).

1.5 Biodisponibilitat

Coneixent la dinàmica dels contaminants en el medi i les matrius ambientals en què tenen més possibilitats de ser-hi presents, en aquest apartat es parlarà dels aspectes que intervenen en la interacció del contaminant amb els organismes diana. La **biodisponibilitat** d'un contaminant fa referència a la fracció biològicament activa d'aquests contaminants, és a dir, a la capacitat d'un contaminant ambiental a assolir un espai diana de l'organisme i causar-li algun efecte (Landis et al., 2011).

La interacció dels contaminants amb els organismes o cèl·lules diana es pot donar a diferents nivells: a l'espai intersticial, a la superfície cel·lular o a l'interior mateix de les cèl·lules.

Les membranes cel·lulars estan formades per molècules amb un cap de fosfat hidrofílic, i una cua lipídica hidrofòbica, que tindran preferència per a molècules hidrofíliques i hidrofòbiques respectivament. Aquesta propietat de les membranes cel·lulars, possibilita que davant dos tòxics de la mateixa mida, essent un apolar i l'altre polar, normalment, el tòxic apolar (més lipòfil) travessarà abans la membrana que no pas el tòxic polar (més hidròfil) (Hughes, 1996).

Un mètode senzill que s'utilitza per aproximar-se a quantificar la biodisponibilitat de determinats contaminants és exposar els organismes a concentracions conegudes del contaminant en qüestió i posteriorment analitzar-ne la concentració en l'organisme o teixits diana. Una altra opció és la utilització de captadors passius de contaminants que permeten estimar la fracció biodisponible de certs compostos imitant els mecanismes d'acumulació i actuant com a substituïts dels organismes test (Huckins et al., 2006). En són un exemple els SPMDs (*Semi Permeable Membrane Devices*) i els DGTs (*Diffusive Gradient in Thin films*) utilitzats per compostos orgànics i metalls respectivament.

La biodisponibilitat d'un contaminant dependrà de les característiques fisicoquímiques del contaminant, de les característiques de l'organisme i les condicions ambientals en què es trobin. La biodisponibilitat dels **contaminants inorgànics** en aigües, ve caracteritzada sobretot per la concentració de contaminants que hi ha en forma lliure i per la concentració que hi ha formant complexos lipòfils. Aquestes concentracions, vindran donades sobretot per les característiques del medi, com poden ser el pH, salinitat o la presència de lligands naturals com els àcids fúlvics i húmics (Andrew et al., 1977). En el cas de les matrius sòlides, per tenir una idea de la biodisponibilitat dels contaminants inorgànics presents, pot servir de guia la concentració de contaminants presents en l'aigua intersticial. Així mateix, la biodisponibilitat dels contaminants inorgànics presents en matrius sòlides, vindrà donada també, per la mida de les partícules a les quals van associats els contaminants. Aquesta propietat serà també la que ajudarà a conèixer la biodisponibilitat dels contaminants inorgànics presents en la matriu aire (Newman, 2010). Boethling i Mackay (2000) afirmaren que l'absorció dels contaminants als pulmons dels organismes superiors és superior per aquells compostos

amb solubilitats en aigua superiors a la solubilitat en lípid, de manera que els compostos polars tendeixen a ser més biodisponibles en aire que els compostos apolars.

La biodisponibilitat dels **contaminants orgànics** en la matriu aigua depèn de les seves propietats químiques com la lipofília, volum molecular, polaritat, etc. En ecotoxicologia, per tal de conèixer la biodisponibilitat dels compostos orgànics a l'aigua, és convenient conèixer el coeficient octanol/aigua (K_{ow}) com a equivalent de la partició lípid/aigua dels compostos orgànics persistents. Pel que fa a la determinació de la biodisponibilitat dels COPs en matrius sòlides (inclosos aquells associats al sòl, sediment, residus i partícules ambientals), aquesta ve determinada principalment per la pKa (força que tenen les molècules de dissociar) en els compostos ionitzables i la K_{ow} en els compostos lipofílics. Per últim, en la matriu aire el sistema respiratori sembla tenir preferència pels compostos inorgànics, més que pels orgànics. No obstant, la lipofília i la volatilitat d'alguns compostos orgànics són propietats a tenir en compte a l'hora d'estudiar la biodisponibilitat potencial d'aquests contaminants a través del sistema tegumentari i respiratori respectivament (Newman, 2010).

1.6 Bioacumulació, biotransformació, biodegradació, bioconcentració i biomagnificació

Una vegada vist com es comporten els contaminants al medi i com poden interaccionar amb els organismes, cal conèixer quin és el seu comportament al llarg del temps. El procés de **bioacumulació** es dona sovint amb els compostos lipòfils i els metalls i es produeix quan la concentració d'un contaminant en els organismes és superior a la concentració que es pot trobar al medi ambient. Aquest fenomen es dona normalment quan un organisme absorbeix una substància tòxica a una velocitat superior a la qual s'elimina. En termes generals, la bioacumulació és la conseqüència neta dels processos d'entrada, biotransformació i eliminació a través d'un individu (Newman, 2010). Els processos de bioconcentració i biomagnificació són casos especials de bioacumulació. Es parla de **bioconcentració** quan un contaminant s'acumula en o sobre un organisme si la font d'aquest és únicament l'aigua. Com que sovint és molt difícil conèixer en condicions de camp la quantitat exacta de contaminant que ha vingut únicament de

l'aigua, es parla més sovint del terme **biomagnificació**, que es refereix a l'acumulació d'un contaminant en un organisme quan la font principal d'aquest és l'alimentació, de manera que la concentració en les cèl·lules dels organismes augmenta paral·lelament al seu nivell tròfic (Landis et al., 2011).

La **biotransformació** és el procés pel qual aquests compostos es poden transformar en altres compostos mitjançant diferents processos metabòlics, que faran alterar-ne la seva toxicitat inicial. Es parla de processos de **biodegradació** quan els compostos es mineralitzen fins a formes inorgàniques.

1.7 Nivells d'actuació dels contaminants.

Els contaminants poden afectar els sistemes biològics a diferents nivells (veure Figura 15): subcel·lular (molecular/bioquímic) → cel·lular → organisme → població → comunitat → ecosistemes → biosfera. Per tant, a l'hora d'estudiar els efectes d'aquests elements, és interessant conèixer les interaccions que es formen entre els diferents nivells organitzatius, ja que alteracions a escala ecosistèmica o de biosfera, poden tenir el seu origen a escala molecular (Newman, 2010).

A través de l'estudi de biomarcadors cel·lulars, es pot estudiar els efectes dels contaminants a nivell **subcel·lular**, tenint en compte que alteracions a nivell bioquímic (enzims, proteïnes, DNA etc) poden acabar provocant disfuncions a nivell **cel·lular**. Com a conseqüència d'això, es poden provocar alteracions a nivell histològic i disfuncions en els òrgans. La citotoxicitat, conseqüència freqüent de l'exposició a tòxics, es pot manifestar en forma de necrosi, apoptosi o inflamació de les cèl·lules. Altres afeccions observables a nivell de teixits i òrgans com a conseqüència dels tòxics són les inflamacions, sovint detectades a través de marcadors d'inflamació. No és necessari que un tòxic causi la mort d'un individu per afirmar que aquest és nociu per als organismes. Els efectes subletals dels contaminants són aquells que s'observen a dosis inferiors a aquelles que causarien la mort somàtica de l'**individu** (Rand, 1985). L'estrès, alteracions del creixement o del desenvolupament, efectes en la reproducció,

canvis fisiològics a nivell immunitari o de comportament, poden ser símptomes de l'efecte subletal d'un contaminant en un individu.

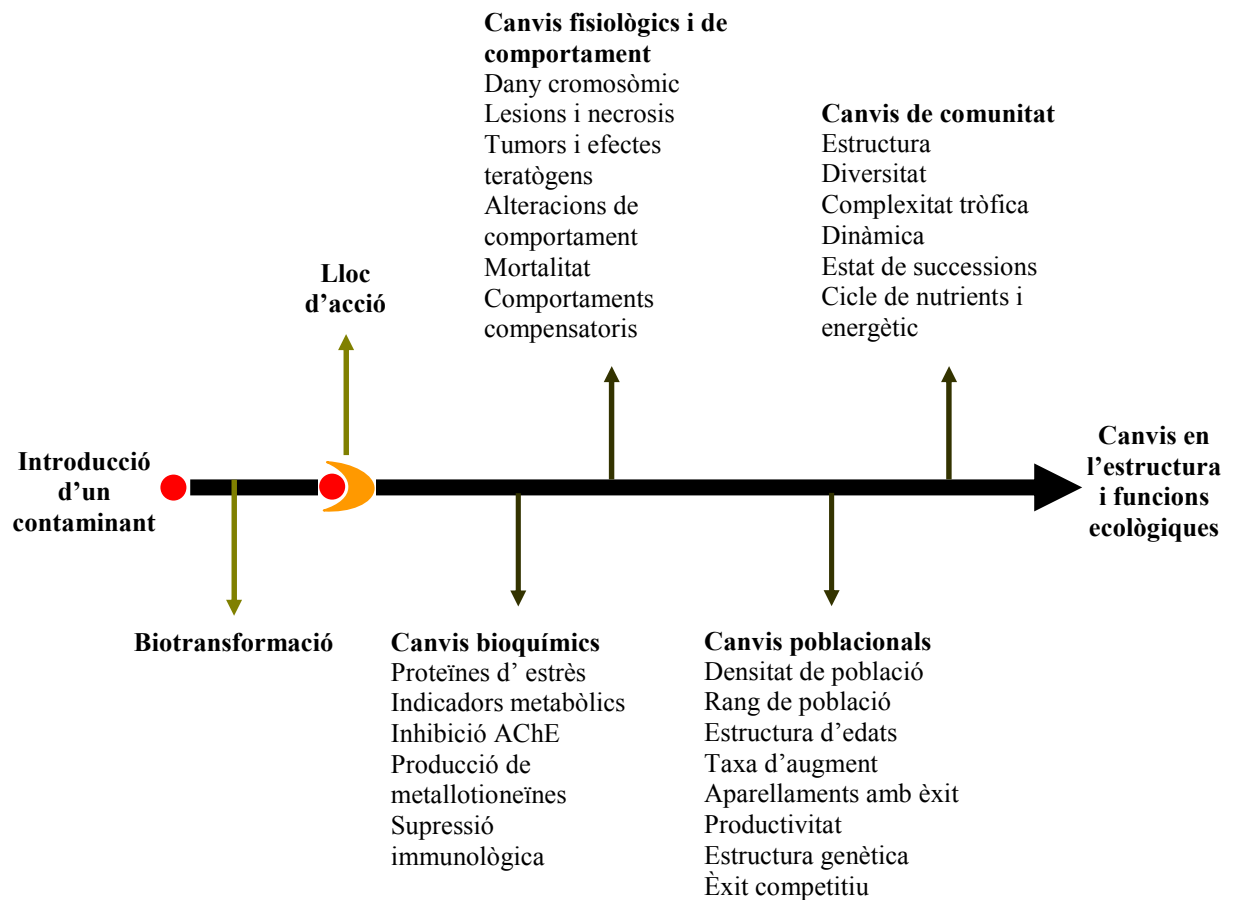


Figura 15. Recull d'alguns efectes que es poden produir a diferents nivells quan un contaminant interacciona amb l'ecosistema (adaptació de Landis et al., 2011).

L'epidemiologia, l'estudi de dinàmiques de poblacions, la demografia i la genètica de poblacions són ciències bàsiques ben conegudes en ecologia i molt importants per poder entendre el comportament dels tòxics a nivell de **poblacions** i arribar a predir-ne els possibles efectes. Per tant, és important conèixer la relació entre els diferents nivells organitzatius per conèixer bé els efectes potencials dels contaminants. Arribant ja als nivells organitzatius superiors, per estudiar els efectes dels tòxics sobre les **comunitats** i ecosistemes, és interessant conèixer, d'una banda les interaccions simples entre espècies (producció, competició..) i de l'altra, l'estructura i el funcionament d'aquestes comunitats. Per tal d'estudiar canvis a nivell estructural, és convenient realitzar estudis a nivell de laboratori, mesocosmos o a camp, treballant amb espècies indicadores de la comunitat. Per últim, sempre cal tenir una mirada posada als efectes globals, ja que

petites accions a nivell local poden provocar alteracions en la composició d'espècies o en el seu metabolisme, fet que de retruc pot acabar repercutint a nivell global.

1.8 Avaluació de la toxicitat: bioassajos

Presentats els principals contaminants analitzats en aquesta tesi, la seva dinàmica en el medi i els diferents nivells als quals poden actuar, en aquest apartat s'abordarà la toxicitat d'aquests contaminants. La **toxicitat** és la propietat o propietats d'un material de produir efectes nocius en un sistema biològic (Landis et al., 2011). Una tècnica força estesa per avaluar la toxicitat de compostos a nivell de laboratori és l'aplicació de **bioassajos** (USEPA 2002c). Els bioassajos són tests de laboratori en els que la toxicitat de la mostra es mesura a partir de l'exposició d'un organisme específic. A l'hora **d'escollir els organismes per als bioassajos**, cal tenir en compte diferents aspectes:

1. És important poder-los obtenir d'un cultiu de laboratori, conèixer-ne les condicions de manteniment i en cas que aquests s'obtinguin directament del seu hàbitat natural, fer-ne un bon triatge i que estiguin en les millors condicions possible.
2. S'han de poder mantenir bé en condicions de laboratori.
3. S'han de conèixer les característiques de cultiu, genètica, història, etc.
4. És important conèixer-ne la seva sensibilitat en relació a diferents tòxics.
5. La sensibilitat de les espècies test ha de ser semblant o assimilable a la d'aquelles espècies de l'ecosistema a les que representa.

Els bioassajos es poden classificar de moltes maneres depenent de diversos paràmetres. Segons el **número d'espècies** i la possible interacció entre elles, es parlarà de tests amb una única espècie aïllada o tests multi espècie. Segons el **temps d'exposició** del tòxic amb els organismes, cal distingir entre assajos aguts quan es dona una exposició curta (que dependrà del tipus d'organisme a testar) i normalment intensa al tòxic (Sprague, 1969) i assajos crònics, quan els efectes apareixen després d'un període prolongat d'exposició. Depenent de les **dimensions del disseny** experimental, podem parlar de bioassajos en microcosmos, mesocosmos (permeten estudiar canvis d'estructura i funció a nivell de comunitat) o estudis de camp que poden ser observacionals o experimentals i

es caracteritzen per a ser els més complexes degut al gran número d'interaccions que existeixen.

En els assajos de toxicitat es pretén avaluar la toxicitat, és a dir la relació entre l'exposició a un tòxic i la possibilitat de patir efectes adversos. Aquesta es realitza amb els **models dosi-resposta**. Consisteixen en exposar un número determinat d'individus a diferents concentracions del contaminant per tal d'avaluar-ne l'efecte a mesura que passa el temps i augmenta la concentració. Un estadístic comú que se'n deriva d'aquests models és la dosi letal 50 (**DL₅₀**) que es defineix com la concentració a la que la mortalitat, respecte a un control, dels organismes assajats que viuen en aquest medi arriba al 50%. En lloc de la DL50, en ecotoxicologia sovint s'utilitza la concentració efectiva 50 (**EC₅₀**) que és la concentració a la que l'efecte mesurat, respecte a un control, és significatiu pel 50% dels organismes assajats que viuen en aquest medi i és el paràmetre que s'utilitzarà per expressar els resultats de toxicitat obtinguts en aquesta tesi.

1.9 Interrelació entre els tres compartiments ambientals: atmosfera, hidrosfera i litosfera.

El sòl, l'aire i l'aigua, són els suports sobre els quals s'assenten tots els fenòmens vitals que es desenvolupen al Planeta. Degut a les interaccions existents entre aquestes tres matrius ambientals i els organismes que hi habiten, qualsevol problema de contaminació originat en una matriu, pot ressentir-se tard o d'hora en alguna de les altres restants.

Aproximadament el 72% de la superfície terrestre està coberta d'**aigua**, de la qual només el 0.7% és aigua dolça i d'aquesta, menys del 0.01% és aigua superficial, de gran importància per a la vida humana (Orozco et al., 2003). Per aquest motiu, i perquè és imprescindible per la vida de molts organismes, és important mantenir una bona qualitat de les aigües superficials. La contaminació d'aquesta matriu pot tenir origen i composició molt diversa: des de les descàrregues puntuals directes a l'aigua de matèria orgànica (Pal et al., 2010; Robles-Vargas et al., 2012; Shon et al., 2006) a contaminació difusa per metalls degut a l'efecte erosiu dels sòls (Nisbet, 2001; Yu et al., 2011) amb la

possibilitat que també tingui un origen atmosfèric com és l'acidificació de les aigües causada per l'augment de CO₂ atmosfèric (Barnosky et al., 2012; Rice i Herman, 2012). La troposfera és la regió de l'atmosfera que es troba en contacte amb la superfície terrestre i es caracteritza per produir-s'hi la major part de fenòmens meteorològics, amb moviments verticals i horitzontals de les masses d'**aire** que proporcionen un mitjà de transport de materials i de dispersió de contaminants (Baskaran, 2011). Les possibles fonts de contaminació de l'aire poden ser tant d'origen natural (volcans, meteorits, etc) com d'origen antropogènic (Nriagu, 1989). La contaminació d'origen antropogènic al mateix temps, pot ser deguda, a fonts mòbils (vehicles de motor per transport) i a fonts fixes localitzades en punts determinats (Colvile et al., 2009; Lewtas, 2007; Orozco et al., 2003;). Una característica peculiar de l'atmosfera, que la diferencia de la resta de compartiments ambientals, és l'elevada capacitat de dispersió dels contaminants gràcies bàsicament al vent i als gradients verticals de temperatura. En aquest context, totes les partícules presents a l'atmosfera, tard o d'hora acabaran dipositant-se a l'escorça terrestre i d'aquesta manera s'incorporaran al sòl o a l'aigua superficial, ja sigui per sedimentació com per l'efecte d'arrossegament de la pluja (Hugo et al., 2000; Orozco et al., 2003).

El tercer element imprescindible per la vida dels organismes a la Terra és el **sòl**. Es considera un sòl contaminat quan hi ha una porció de terreny superficial o subterrani, la qualitat del qual s'ha alterat com a conseqüència de l'abocament, directe o indirecte de residus o productes perillosos (Orozco et al., 2003). La contaminació dels sòls, es pot deure a multitud de causes com: activitats industrials i agrícoles, deposició de residus sobre el terreny, fuites industrials, etc. (Chander et al., 2001; Nicholson et al., 2003). La interacció entre els diferents compartiments ambientals fa que els contaminants presents al sòl puguin causar efectes a aigües subterrànies i superficials a través de lixiviats o escòrrecs respectivament (Yu et al., 2011), i a l'aire a través de la combustió o evaporació dels contaminants (Farhan et al., 2002; Hippelein i Mclachlan, 1998).

L'augment global de la població i el desenvolupament de la industrialització han activat de forma considerable la degradació del medi ambient essent un dels principals problemes la generació de residus i particularment aquells originats en la depuració d'aigües residuals. La producció de fangs de depuradora, pot acabar tenint conseqüències a tots els compartiments ambientals, ja que entre les diferents vies de

reciclatge, s'inclou la incineració i per tant, possible font de contaminació atmosfèrica, i la utilització en agricultura, i per tant, possible font de contaminació de sòls i aigües (Alabaster i Leblanc, 2008; Rovira et al., 2011).

1.10 Hipòtesi

L'exposició a mescles de contaminants ambientals pot causar diferents efectes que els que causaria l'exposició als mateixos contaminants de manera individualitzada. L'anàlisi dels contaminants no és suficient per poder predir l'efecte tòxic d'aquests sobre els organismes del medi, de manera que l'aplicació de bioassajos o tests de toxicitat pot ser una bona eina per a predir l'impacte sobre els ecosistemes derivat de la presència de contaminants.

1.11 Objectius

Objectiu General

L'objectiu general d'aquesta tesi és avaluar l'aplicabilitat de bioassajos específics així com també un bioassaig estandarditzat genèric (Microtox[®]) en diferents matrius ambientals per tal de complementar la informació obtinguda dels nivells de contaminació química amb els resultats d'ecotoxicitat, com a base per poder establir un millor diagnòstic ambiental.

Objectius Específics

A continuació, es detallen els objectius específics marcats en aquesta tesi:

- Avaluar la contaminació d'aigües i sediments fluvials mitjançant la combinació de tècniques convencionals de mostreig i captadors passius d'aigua (DGTs i SPMDs).
- Valorar la idoneïtat de l'ús de bioassajos amb *Vibrio fischeri* i *Pseudokirschneriella subcapitata* per avaluar l'ecotoxicitat d'aigües i sediments fluvials.
- Caracteritzar i avaluar l'ecotoxicitat de residus orgànics (fangs de depuradora), mitjançant l'aplicació de bioassajos amb plantes (*Allium cepa*, *Lolium perenne* i *Raphanus sativus*) i amb *Vibrio fischeri*.
- Estudiar la influència de les principals tècniques de processament dels fangs de depuradora en la presència de contaminants i la seva ecotoxicitat, així com també caracteritzar la fertilitat i acumulació de metalls en sòls adobats amb aplicacions repetitives de fangs de depuradora compostats.

- Avaluar els efectes derivats de la fertilització amb fangs de depuradora sobre algunes funcions del sòl, com la mineralització del carboni i nitrogen i algunes activitats enzimàtiques, i valorar la possible fitotoxicitat mitjançant bioassajos amb plantes (*Allium cepa*, *Lolium perenne* i *Raphanus sativus*) i l'ecotoxicitat amb *Vibrio fischeri*. Comparar els efectes a llarg termini de la fertilització sistemàtica a dosis controlades envers l'aplicació de forma i a dosis poc controlades.
- Avaluar la idoneïtat de diferents tests *in vitro* per estudiar l'ecotoxicitat (*Vibrio fischeri*), citotoxicitat (MTT Assay) i genotoxicitat (Comet Assay) de contaminants atmosfèrics associats a partícules inferiors a 10 µm (PM₁₀) de mostres d'aire.

2. METODOLOGIA

En aquest apartat s'inclou un resum dels mètodes generals de mostreig en sòls, sediments, residus, aigües i aire. Seguidament es descriu breument els anàlisis químics realitzats per a determinar els diferents contaminants estudiats en cada matriu ambiental i s'inclou un apartat d'explicació bàsica dels bioassajos que aniran sortint al llarg de la tesi. Per últim, es mencionen els tests estadístics utilitzats pel tractament de les diferents dades que s'han anat obtenint.

2.1 Mètodes generals de mostreig

2.1.1 Mostreig de sòls, sediments fluvials i residus

Pel mostreig de sòls, sediments i residus (fangs de depuradora) s'han recollit mostres compostes per diverses submostres (el nombre varia en cada cas) per tal de garantir la representativitat dels mostres. En el cas dels sediments, s'han agafat a una profunditat aproximada d'entre 0 i 5 cm donat que és en la zona més superficial del sediment on s'acostumen a acumular més contaminants. En el cas del mostreig de sòls s'han agafat mostres a una fondària entre 0 i 20 cm. Aquesta equival aproximadament a la totalitat de l'horitzó A_p dels sòls agrícoles estudiats.. Pel mostreig de residus es recull aproximadament 2 kg de mostra prèviament homogeneïtzada.

En funció de les anàlisis que es faran a cada mostra es recullen en diferents recipients. Els recipients per anàlisis de metalls, es renten prèviament amb àcid nítric al 10% i els recipients per a compostos orgànics són de vidre i es renten prèviament amb diclormetà. La conservació de les mostres es realitza en fred (4°C) fins a l'arribada al laboratori. A partir d'aquí, per a la caracterització dels sòls, sediments i fangs, aquests s'assequen a l'aire fins a pes constant, s'homogeneïtzen i es tamisen a 2 mm. Pels bioassajos i els anàlisis de compostos orgànics es guarden a 4°C i es processen en fresc.



Figura 1. Mostres de sediments fluvials recollides amb envasos de vidre àmbar

2.1.2 Mostreig d'aigua fluvial

S'han realitzat mostrejos d'aigua puntual així com mitjançant mostrejadors passius per tal d'avaluar la contaminació i l'ecotoxicitat d'aigües de diferents rius.

Mostreig puntual d'aigua i aigua filtrada

La recollida de mostres puntuals d'aigua fluvial s'ha realitzat amb ampolles de vidre àmbar, prèviament rentades amb àcid nítric diluït al 10%. Es recull una mostra d'aigua fluvial, i una mostra d'aigua fluvial filtrada *in situ* amb filtres de 0.45 µm de porus. Ambdós tipus de mostres s'acidifiquen *in situ* amb àcid nítric 65% i es conserven en refrigeració (4°C) fins el moment del seu processament a laboratori. Al mateix temps de fer el mostreig d'aigua, mitjançant una sonda multiparamètrica (HORIBA U-50) s'ha determinat la temperatura, el pH i la concentració d'oxigen dissolt.



Figura 2. Mostreig d'aigua fluvial total i aigua filtrada en envasos de vidre àmbar

Mostreig dels contaminants presents a l'aigua mitjançant mostrejadors passius

Recentment, s'han dissenyat diferents metodologies pel mostreig passiu d'aigua que permeten entre d'altres coses estimar la concentració mitjana de contaminants en l'aigua durant un període conegut de temps, evitant així possibles fluctuacions degut a descàrregues puntuals de contaminants (Augulyte i Bergqvist, 2007). També tenen l'avantatge de poder ser utilitzades per a simular la fracció biodisponible dels contaminants i poder conèixer la fracció que potencialment pot ser tòxica, a més de permetre baixar els límits de detecció. Una de les aplicacions noves dels mostrejadors passius és la capacitat d'obtenir extractes de la fase adsorbida i fer-ne bioassajos per avaluar l'ecotoxicitat dels contaminants acumulats, tant polars com apolars (Namiesnik i Szefer, 2009). A continuació es detallen algunes característiques dels mostrejadors passius utilitzats.

➤ **DGTs (Difusive Gradient in Thin films)**

Els DGTs (DGT Research, Lancaster, UK) són un tipus de mostrejadors passius basats en una capa de resina *Chelex* impregnada amb un hidrogel que permet acumular metalls. Estan dissenyats per sorbir metalls en forma iònica i metalls formant complexes làbils (enllaç feble) amb lligands orgànics o inorgànics (Zhang, 2003) ja que ambdós es consideren les formes més biodisponibles. Es disposen al riu, per triplicat en cada punt de mostreig, durant 7 dies. La seva localització al riu, sempre ha d'intentar ser en un lloc on l'aigua no estigui estancada, que hi hagi certa corrent, que quedin totalment submergits però evitant sempre el contacte amb el sediment. Un cop es retiren de l'aigua, s'emmagatzemen refrigerats a 4°C fins al seu processament al laboratori. La concentració de metalls en els DGTs es calcula seguint les descripcions de Zhang, (2003).

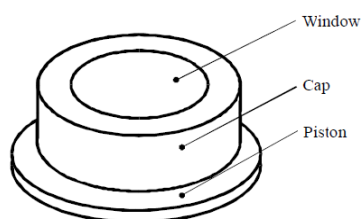


Figura 3. Esquema d'un sistema DGT



Figura 4. Imatges del mostreig amb DGTs. a i b) retirada dels DGTs del sistema fluvial. c) processament dels DGTs al laboratori.

➤ SPMDs (Semi Permeable Membrane Devices)

Els SPMDs (ExposMeter, Taveljöv, Sweden) són mostrejadors passius en forma de membrana de polietilè de baixa densitat amb porus de $10\mu\text{m}$ de diàmetre que conté a l'interior un lípid d'elevat pes molecular (trioleïna) que correspon al principal líquid de reserva dels organismes i per tant permet així imitar el teixit adipós d'aquests. S'utilitzen tant en aire com en aigua, per a mostrejar compostos apolars hidrofòbics que són fàcilment biodisponibles pels organismes (PAHs, PCBs, PCDD/Fs, etc) (Augulyte and Bergqvist, 2007; Huckins et al., 1999; Kočí et al., 2003). A cada punt de mostreig es col·loquen un total de 4 SPMDs-PRC per l'anàlisi dels compostos orgànics i una membrana SPMD-TOX per a testar l'ecotoxicitat dels compostos retinguts a l'SPMD. Aquests dispositius es deixen dins el riu durant 21 dies totalment submergits sense tocar el sediment i ben subjectats per evitar ser arrossegats per possibles avingudes. Un cop retirats del riu, s'emmagatzemen a 4°C fins al seu processament a laboratori. L'estimació del volum d'aigua mostrejat durant els 21 dies de mostreig així com també la concentració de compostos obtinguda en cada membrana es calcula gràcies a la presència d'alguns compostos orgànics marcats isotòpicament (PAHs i PCBs) i mitjançant les indicacions descrites per Augulyte i Bergqvist (2007).

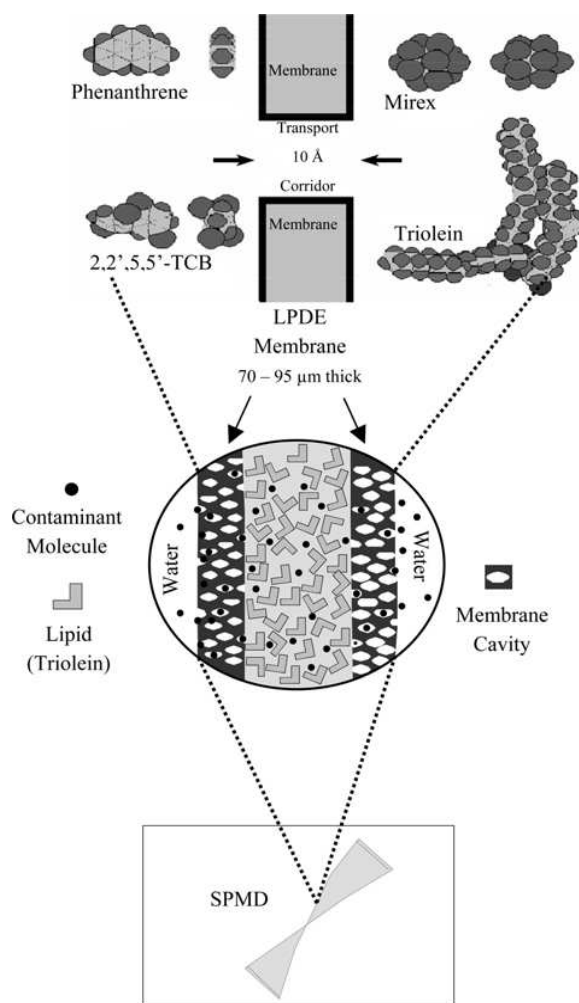


Figura 5. Esquema del funcionament dels sistemes SPMD. Representació del sistema d'entrada dels contaminants orgànics a través dels porus de les membranes (extret de Huckins et al., 2006).



Figura. 6. SPMDs. A) SPMDs dins el canister. B) spider amb la membrana SPMD. C) comparació de les membranes sortint del sistema fluvial amb les membranes netejades abans del magatzem pel laboratori.

2.1.3 Mostreig de les partícules ambientals PM₁₀

La presa de mostra es realitza seguint la directiva de qualitat del aire 1999/30/EC. Per a la presa de mostra de metalls lligats a partícules PM₁₀, s'utilitzen captadors d'alt volum model 6070-DV (Tisch Environmental) d'acord amb el mètode US EPA IO-2.1 (USEPA, 1999a), durant 24h. Per la presa de mostra de PCDD/Fs s'utilitzen captadors d'alt volum TE-1000 de (Tisch Environmental) d'acord amb el mètode US EPA TO-9 (USEPA, 1999b), durant 48h. La fase lligada a partícules de metalls, dioxines i furans es recull sobre filtres de microfibra de quars (QFF). Els filtres per a l'anàlisi de metalls es guarden dins un sobre a temperatura ambient, mentre que els filtres per a l'anàlisi de PCDD/Fs es guarden en un recipient hermètic de vidre color ambre amb tap de tefló per tal d'evitar la fotodegradació dels compostos. Posteriorment, es congelen les mostres a -20°C fins al moment de la determinació analítica.

2.2 Anàlisi de contaminants

2.2.1 Metalls i metal·loides

Pretractament de les mostres per l'anàlisi de metalls i metal·loides

Les **mostres sòlides** per a la determinació de metalls, després d'assecar-se a 45°C, s'homogeneïtzen i després es tamisen. En el cas dels filtres de QFF de les **mostres d'aire**, es retalla un octau i s'esmicola a porcions el més petites possibles.

Posteriorment, les mostres es digereixen amb àcid nítric 65% Suprapur (E. Merck, Darmstadt, RFA), i en el cas dels filtres d'aire s'hi afegeix també àcid fluorhídric (37.5%, Panreac SA, Castellar del Vallès, Barcelona, Espanya). La digestió es du a terme mitjançant dos possibles tècniques en funció de la matriu en què es treballi:

- a) En bombes hermètiques de Tefló, amb àcid nítric (65% Suprapur, E. Merck, Darmstadt, Germany) durant 8 h a temperatura ambient, i escalfades a 80 °C durant 8 h més (Nadal et al., 2004). Aquesta tècnica s'ha utilitzat en els sediments, els fangs de depuradora i en els filtres d'aire.

- b) Mitjançant una digestió en microones (Milestone Start D Microwave Digestion System; Milestone Srl, Bergamo, Italia) amb àcid nítric (65% Suprapur, E. Merck, Darmstadt, Germany) durant 10 minuts fins arribar als 165°C i mantenint-les a la mateixa temperatura durant 20 minuts més. Aquesta tècnica s'ha utilitzat en els sòls seguint el Mètode 3051A de la US EPA (US EPA, 2007).

Pel que fa als mostrejadors passius **DGT**, s'ha realitzat una desorció dels metalls extraient la capa de resina i col·locant-la amb HNO₃ 1 M durant tota la nit (Zhang, 2003).

Finalment, les mostres digerides i extractades s'han deixat refredar, s'han filtrat i s'han reconstituït amb aigua desionitzada per a poder ser analitzades. Les mostres d'aigua i aigua filtrada prèviament acidificades a camp, no han necessitat pretractament.

Determinació analítica de metalls i metal·loides

La determinació de metalls s'ha realitzat mitjançant espectrometria de masses de plasma acoblat inductivament (ICP-MS), mitjançant espectrometria d'emissió atòmica acoblat inductivament (ICP-OES) o per mitjà d'espectrometria d'absorció atòmica (AAS) depenent de la matriu. Per al control de qualitat s'han utilitzat blancs, mostres control i materials certificats de referència en funció de cada matriu. Alguns dels metalls analitzats en les diferents matrius ambientals han estat: arsènic, cadmi, cobalt, crom, mercuri, coure, manganès, molibdè, níquel, plom, estronci, antimoni, tal·li, vanadi i zinc.

2.2.2 Contaminants orgànics

Pretractament de les mostres per l'anàlisi de contaminants orgànics

Per tal d'extreure els compostos orgànics d'una matriu, generalment cal l'ajuda de dissolvents orgànics. En el cas dels sòls i residus, l'extracció s'ha realitzat mesclant aproximadament 1g de la mostra amb 15 mL d' acetona:hexà a parts iguals i afegint-li sulfat sòdic anhídrid per tal d'eliminar-ne la humitat. En el cas dels filtres d'aire, l'extracció de PCDD/Fs s'ha realitzat mitjançant una extracció accelerada (ASE) amb

toluè. Depenent de la matriu en què es treballés, l'extracció s'ha realitzat mitjançant microones seguint el mètode US EPA 3546 (US EPA 2000a) a 115 °C durant 20 min a una pressió de 150 PSI, mitjançant extracció successiva tres vegades amb un bany d'ultrasons a 50 °C durant 30 min seguint el mètode US EPA 3550B (US EPA 1996a) o mitjançant un sistema d'extracció accelerada amb un sistema DIONEX ASE 300.

Determinació analítica dels compostos orgànics

La determinació dels contaminants orgànics s'ha dut a terme per cromatografia de gasos d'alta resolució (HRGC) acoblat a espectrometria de masses d'alta resolució (HRMS) o mitjançant cromatografia de líquids (LC) acoblada a espectrometria de masses en tàndem (HPLC-MS/MS) depenent de la matriu i el tipus de contaminants a analitzar. Alguns dels contaminants orgànics analitzats han estat: PCDD/Fs, PCBs, PAHs, NPE, HCH, PBDEs, PCNs, PFOS i PFOA.

Per altra banda, els compostos fenòlics solubles de les mostres de sòls i residus, s'han determinat a partir d'un extractat amb aigua desionitzada (residus) o CaCl₂ (sòls) a una relació 1:5 (pes: volum) i s'han analitzat segons el mètode de Folin Ciocalteau (Box, 1983).

2.3 Bioassajos

Pre-tractament de les mostres

L'obtenció de dos extractes diferents de les mostres, un orgànic i un aquós, permet diferenciar la toxicitat que ve dels compostos orgànics de la que prové dels compostos inorgànics retinguts en una matriu (normalment, sòls, sediments o residus). Els **extractes aquosos** s'obtenen mesclant el sòlid amb NaCl al 2% (en algunes ocasions lleugerament acidificat) mantenint-ho en agitació constant durant 12 hores i posteriorment filtrant-ho amb filtres de porus inferior a 0.47 µm. Per a l'obtenció dels **extractes orgànics**, es realitza una extracció amb microones (temperatura entre 100 i 115°C i pressió entre 50 i 150 psi durant 10-20 minuts) amb dissolvents orgànics

(acetona:hexà a parts iguals) seguint el mètode estàndard 3546 de la US EPA (US EPA, 2000a). Posteriorment aquests extractes es filtren, es rotaevaporen i el romanent final es recull amb dimetilsulfòxid (DMSO), un dissolvent de baixa toxicitat pels organismes que s'utilitzen.

En el cas dels extractes dels **SPMDs-TOX** per a toxicitat, les membranes de SPMDs es sotmeten a una diàlisi amb un dissolvent capaç d'alliberar tots els possibles contaminants retinguts a la trioleïna. Prèviament a les diàlisis de les mostres dels SPMDs-TOX definitives, es realitzaren diferents assajos amb diferents dissolvents per tal d'escollir aquell dissolvent apolar que presentés menor toxicitat envers *Vibrio fischeri*. Finalment el dissolvent escollit per a realitzar les diàlisis dels SPMDs-TOX fou el n-hexà ultrapur. Posteriorment igual que en els extractes orgànics, es rotaevapora tot el dissolvent i la fracció restant es recull amb DMSO.

Pel que fa als **filtres d'aire**, es realitza una extracció aquosa mitjançant una digestió àcida dèbil (15 mL d'HNO₃ 0.1M al 2% de NaCl) amb microones d'un octau de filtre (64.4cm²), seguint el protocol 3051 de la EPA (US EPA, 2007b). Després de la digestió per microones, es filtra l'extracte i es neutralitza amb hidròxid sòdic fins assolir un pH de 7.0 ± 0.25 per tal de poder realitzar els diferents bioassajos.

Bioassajos aplicats

2.3.1 Microtox[®]-*Vibrio fischeri*

Els tests d'ecotoxicitat basats en microorganismes, tenen l'avantatge de ser “cost-effective” ja que són ràpids i senzills d'aplicar (Ocampo-Duque et al., 2008). Les comunitats microbianes en general, i especialment els bacteris, juguen un paper important en el cicle dels nutrients, en la descomposició orgànica i el destí dels contaminants en sediments aquàtics. El test comercial Microtox[®] és un bioassaig *in vitro* àmpliament utilitzat per avaluar l'ecotoxicitat aguda de productes químics, aigües i residus. Aquest test es basa en comparar l'emissió de llum que produeixen els bacteris luminescents (*Vibrio fischeri*) quan s'exposen a una mostra, amb l'emissió de llum dels bacteris controls, exposats a una solució control o blanc. La diferència entre l'emissió de llum entre els bacteris control i els exposats a la mostra s'atribueix a l'efecte tòxic

que produeix la mostra sobre els organismes. *Vibrio fischeri* és un bacteri luminescent, que si es troba en condicions òptimes per desenvolupar-se, emet llum com a producte de la seva respiració cel·lular. És a dir, la bioluminescència bacteriana està íntimament associada amb la respiració cel·lular, de manera que qualsevol efecte que provoqui una inhibició de la respiració resultarà amb un canvi en la taxa de bioluminescència (Fulladosa, 2004). Microtox[®] és un test d'espècie única, que avalua la toxicitat aguda a nivell bioquímic i/o cel·lular.



Figura 7. Microtox[®] Model 500 Analyser (SDI, USA)

Vibrio fischeri és un bacteri marí que viu en concentracions de NaCl entre 5 i 30 g/L (en el test, es treballa en concentracions salines de 20 g/L). El seu pH òptim és entre 7.0 i 7.2 (rang de tolerància: 4.5-9.0) (Villaescusa et al., 1997). La temperatura a la que es desenvolupa el test és de 15°C. Tenint en compte aquestes condicions de treball, seran limitacions per a l'aplicació del test els desajustos de pH o de salinitat a més de mostres tèrboles o de color.

Per a la realització d'aquest assaig s'ha utilitzat el Model 500 Analyser (SDI, USA) del test de toxicitat aguda Microtox[®] i s'ha seguit el protocol descrit per Azur Environmental, (1999). En totes les aplicacions, s'ha estimat la EC₅₀ que representa la concentració de compost que causa un 50% de la inhibició de llum emesa inicialment pels bacteris.

Aquest assaig s'ha aplicat a totes les matrius ambientals estudiades (aigua, sediments, sòls i aire), així com també amb fangs de depuradora.

2.3.2 Test d'inhibició del creixement d'algues d'aigua dolça. *Pseudokirschneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*)

Les algues són importants productors primaris en els sistemes aquàtics. L'espècie d'alga d'aigua dolça que s'ha escollit per a realitzar aquest test ha estat *Pseudokirschneriella subcapitata*, coneguda antigament com a *Selenastrum capricornutum*. Aquesta espècie és un cloròfit o alga verda, unicel·lular amb forma de mitja lluna. El seu volum aproximat es troba entre els 40 i 60 mm³ i és típica de sistemes aquàtics epicontinentals (Pica et al., 2004). Tenint en compte que aquesta espècie és molt sensible a la presència de contaminants i que el seu creixement en condicions de laboratori és relativament fàcil (Geis et al., 2000), la fa ser una bona candidata per a l'avaluació de la contaminació de les aigües dels sistemes fluvials. El test s'ha realitzat seguint el protocol estandarditzat OECD 201 (OECD, 1984). Aquest test es basa en que les cèl·lules al ser exposades a substàncies tòxiques, se'ls hi afecta la reproducció i en conseqüència s'altera la taxa de creixement de la població. Breument, consisteix en afegir en tubs d'assaig inòcul de la solució mare d'algues amb contacte amb la mostra per quadruplicat. En el cas dels extractes de sediments, s'afegeixen 4.5 mL d'inòcul d'algues en 0.5 mL d'extracte de sediment. En el cas dels extractes dels SPMD-TOX, s'afegeixen 4.95 mL d'algues amb 50 µL d'extracte d'SPMD-TOX. En cada test, s'afegeixen 6 mostres control: dues de les quals es desen al frigorífic per evitar-ne el creixement i tenir una referència de la concentració inicial de cèl·lules i les altres 4 s'incuben en les mateixes condicions que les mostres contaminades. Durant la realització del test, es controla la temperatura de l'aigua ($24 \pm 2^\circ\text{C}$), s'incorpora llum fluorescent freda amb il·luminació contínua ($60 \mu\text{Einstein s m}^2/\text{s}$) i es controla el pH de la solució test que ha de ser de 7.5 ± 0.1 . S'incuba durant 72 h agitant els tubs cada dia per mantenir l'intercanvi gasós de les mostres. Al quart dia, es realitza el comptatge de cèl·lules per a cada mostra emprant un citòmetre de flux. Les dades es processen mitjançant el software Accucomp-1.15.



Figura 8. Imatges de *Pseudokirschneriella subcapitata* a microscopi (esquerra) i de l'equip de citometria emprat pels estudis (dreta).

Tot i la seva curta durada, aquest test permet avaluar l'efecte crònic, degut a les característiques de creixement d'aquests organismes. Es tracta d'un test d'espècie única, estàtic, que permet observar efectes a nivell cel·lular. Està dirigit sobretot a avaluar substàncies solubles en aigua. La importància de realitzar aquest test és que les algues unicel·lulars són productors primaris unicel·lulars. Per tant, els impactes que s'observin sobre aquests organismes fotosintètics unicel·lulars, poden tenir efectes a llarg termini sobre la resta de la comunitat. Així, aquesta espècie és bona candidata per avaluar els impactes tòxics en aigües dolces.

Aquest assaig s'ha aplicat a extractes aquosos de sediments fluvials i extractes orgànics de sediments fluvials i SPMDs.

2.3.3 Tests d'avaluació de la fitotoxicitat

A l'hora d'avaluar la fitotoxicitat d'una mostra, és important distingir la matriu amb la que s'està treballant, per tal d'escollir el test que més s'adeqüi a la finalitat d'estudi. En sòls, una possibilitat és realitzar el test d'inhibició del creixement de la planta, mentre que en residus pot ser interessant avaluar-ne la toxicitat mitjançant el test de germinació i elongació de l'arrel.

Les espècies de plantes utilitzades per a avaluar la fitotoxicitat de les mostres han estat:

Lolium perenne (margall o raigràs perenne) → espècie monocotiledònia de la família de les poàcies.

Allium cepa (ceba) → espècie monocotiledònia de la família de les liliàcies

Raphanus sativa (rave) → espècie dicotiledònia de la família de les brassicàcies.

A continuació es descriuen breument cadascun dels tests aplicats:

- a) **Test de germinació/elongació de l'arrel.** Aquest test es desenvolupa segons el test estàndard de la US EPA Ecological Effects Test Guidelines (USEPA, 1996b): s'exposen deu llavors de cada espècie de planta per quadruplicat a un volum conegut d'extracte aquós del sòlid (5 mL) a avaluar. Aquest test normalment es realitza en plaques de petri amb paper de filtre a la base que permet la retenció de l'extracte i aguanta la humitat. Finalment es calcula l'índex de germinació (GI) comparant el número de llavors germinades i la longitud de les arrels respecte els seus controls (Zucconi et al., 1985). Aquest test s'ha realitzat en els extractes aquosos de fangs i composts de depuradora.

- b) **Test d'inhibició del creixement de planta.** Aquest test es realitza seguint la norma OECD 208 (OECD, 2006). Està destinat principalment a avaluar la fitotoxicitat de compostos i productes que s'apliquin al sòl. Per a dur-lo a terme, en aquest cas es sembren 5 llavors de cada espècie en un germinador amb 15 g de sòl per quadruplicat, es rega regularment i passats de 14 a 28 dies després de la germinació de com a mínim el 50% dels individus del sòl control (que no ha rebut contaminants o fang de depuradora) es mesura la longitud dels brots. Aquest test s'ha realitzat amb mostres de sòls fertilitzats amb fangs i composts de depuradora.



Figura 9. A l'esquerra, imatge del test de germinació/elongació de l'arrel. A la dreta, imatge del test d'inhibició del creixement de planta.

2.3.4 Paràmetres indicadors de la funció del sòl

Per avaluar l'efecte de l'aportació de fangs i composts de depuradora al sòl s'han realitzat assajos per tal d'observar canvis de funcionament de la microbiota d'aquest així com d'algunes activitats enzimàtiques pròpies d'aquest.

a) Efectes sobre els microorganismes del sòl

S'han realitzat dos assajos diferents per tal de valorar l'efecte sobre el cicle de la matèria orgànica: el test de mineralització del carboni i el test de mineralització del nitrogen. L'alteració dels microorganismes responsables de mineralitzar el carboni i el nitrogen pot implicar canvis en les funcions bàsiques del sòl com ara la de regulació dels cicles biogeoquímics (C, N).

➤ Mineralització de Carboni

Per poder avaluar el grau de mineralització del carboni per part dels microorganismes del sòl, es van realitzar una sèrie de respirometries. La respirometria és una tècnica que mesura l'activitat de la microbiota heteròtrofa aeròbia del sòl. L'activitat microbiana de les mostres de sòls, es valora incubant la mostra en respiròmetres manomètrics (Oxitop® OC 110, WTW GmbH, Weilheim, Alemanya). Aquests consten d'unes ampolles de 0,5 L de capacitat equipades amb un tap hermètic que incorporen transductors de pressió que permeten fer lectures precises dels canvis de la pressió durant el temps d'incubació. Als reactors hi ha també un absorbent de CO₂, de manera que els canvis de pressió enregistrats es corresponen al consum d'oxigen en resposta al metabolisme dels microorganismes.

El sòl (25 g de sòl sec) s'ajusta al 60% de la capacitat de camp i s'incuben les mostres a 25°C a les fosques durant 21 dies. Durant la incubació, s'enregistra periòdicament l'oxigen consumit per la mostra. L'oxigen total consumit per la mostra al llarg dels 21 dies d'incubació l'anomenem respiració acumulada (CR). Un cop finalitzada la incubació es determina la respiració induïda per substrat (SIR) que consisteix en quantificar l'O₂ consumit després de 12 h d'haver afegit un substrat (4g de glucosa per kg de mostra) a les mostres incubades (ISO, 2002; OECD, 2000b). La respiració basal (BR) es calcula com la respiració horària mitjana dels últims 5 dies d'incubació. El

quocient d'activació respiratòria (QR) es calcula dividint la BR per la SIR, tal i com marca el mètode ISO 17155 (ISO, 2002).



Figura 10. Respiròmetres manomètrics dins un incubador.

➤ **Mineralització de Nitrogen**

Aquest assaig permet valorar la capacitat de mineralització i nitrificació del nitrogen orgànic per part de la microbiota del sòl. Aquest test s'ha realitzat amb mostres de sòls seguint les recomanacions de la norma 216 de la OECD (OECD, 2000a). L'objectiu d'aquest test és veure com afecta a llarg termini l'activitat microbiològica que intervé en el cicle del nitrogen en un sòl. A la mostra a testar, se li afegeix farina d'alfals (com a font de nitrogen) i aigua fins al 50% de la seva capacitat de camp, i s'incuba a 25°C durant 28 dies. Al llarg d'aquests dies, es va airejant la mostra per a permetre l'intercanvi gasós. Al final de la incubació es realitza l'extracció de nitrat amb KCl 0.1N i s'avalua colorimètricament la concentració segons el mètode 352.1 de la US EPA (US EPA, 1971). La taxa de formació del N a les mostres es compara a la dels controls i se'n calcula la desviació.

b) Efectes sobre algunes activitats enzimàtiques del sòl

Els enzims del sòl (intra i extracel·lulars) intervenen en multitud de reaccions de transformació tant de la matèria orgànica com dels nutrients. L'avaluació de les activitats enzimàtiques pot ser un bon indicador de la qualitat del sòl (García et al., 2003).

➤ **Activitat ureasa (UA)**

L'enzim ureasa és un enzim relacionat amb el cicle del nitrogen del sòl de manera que permet avaluar indirectament l'estat dels microorganismes del sòl que intervenen en aquest procés. La ureasa catalitza la reacció d'hidròlisi d'urea cap a diòxid de carboni i amoni, trobant-se tant a microorganismes com a plantes i animals (Tabatabai, 1982). Per a l'avaluació de l'activitat ureasa, s'utilitza el mètode de Kandeler i Gerber (1988), basat en la determinació de l'amoni alliberat en la incubació d'una solució de la mostra a 37°C durant 2 h. La determinació de l'amoni es realitza a través de la reacció de Berhelot. En aquest mètode, l'amoni produït per l'activitat ureasa dels microorganismes, reacciona amb salicilat i dicor-isocianur, generant un color verd-blavós. L'absorbància a 690 nm és directament proporcional a la concentració de nitrogen amoniacal. La densitat òptica relativa mesurada, es transforma en concentració mitjançant una recta patró obtinguda amb concentracions conegudes d'amoni. L'activitat ureasa es calcula a partir de l'equació: $UA = [(S - B) \times V] / (Pm \times G \times T)$, on:

$$UA = \text{activitat ureasa } (\mu\text{mol N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ sòl sec h}^{-1})$$

$$S = \mu\text{g de N-NH}_4^+ \text{ a les mostres obtingudes en la corba patró}$$

$$B = \mu\text{g de N-NH}_4^+ \text{ pels controls}$$

$$V = \text{volum total de l'extracte d' incubació (mL)}$$

$$Pm = \text{pes atòmic de l'amoni (18 g mol}^{-1})$$

$$G = \text{quantitat de sòl sec utilitzat (g)}$$

$$T = \text{temps d'incubació (hores)}$$

➤ **Activitat deshidrogenasa (DH)**

Aquest paràmetre també està relacionat amb l'activitat biològica del sòl. Pel seu anàlisi es segueix el mètode descrit per Garcia et al., 2003, el principi del qual es basa en l'estimació del idonitrotetrazolio formazán (INTF) format per reducció quan el sòl és incubat amb 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-feniltetrazolio (INT) amb absència de tampó. La reacció que succeeix és: $\text{INT} + 2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{INTF}$ (490 nm). Posteriorment, les mostres es deixen incubar a 20°C en completa foscor durant 20 h. Després de l'extracció

amb metanol, les mostres s'analitzen amb un espectrofotòmetre a 490 nm. La DH es calcula a partir de l'equació: $DH = (C \times V) / (Pm \times G \times T)$, on:

DH = activitat deshidrogenasa ($\mu\text{mol INTF format g}^{-1}\text{h}^{-1}$)

C = quantitat d'INTF de la mostra, en $\mu\text{g ml}^{-1}$

Pm = pes molecular de INTF (471.3 g mol^{-1})

V = factor de dilució

G = pes del sòl sec

T = temps d' incubació (20 hores)

2.3.5 Tests de citotoxicitat i genotoxicitat

Els tests de citotoxicitat i genotoxicitat s'han aplicat per tal d'avaluar la toxicitat potencial de les partícules PM_{10} (partícules ambientals inferior a $10 \mu\text{m}$ de diàmetre) retingudes en els filtres d'aire prèvia extracció en medi aquós (veure apartat 2.3.1). Aquests tests *in vitro* avaluen el dany potencial dels contaminants a nivell bioquímic que acaben desencadenant danys a nivell cel·lular i individual. Per a realitzar aquests estudis, s'utilitzen cultius cel·lulars de la línia **A549**, corresponents a cèl·lules epitelials humanes procedents de carcinoma pulmonar (ATCC. CCL-185). Aquest tipus de cèl·lules són molt adients per a estudiar els efectes de les partícules ambientals atmosfèriques ja que es poden considerar cèl·lules diana en contaminació atmosfèrica.

➤ Test de citotoxicitat o MTT Assay

El test MTT o [bromur de 3-(4,5-Dimetilthiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoli] permet avaluar la viabilitat cel·lular mitjançant una reacció enzimàtica. Es basa en la capacitat de l'enzim mitocondrial succinat-deshidrogenasa d'hidrolitzar el compost MTT (de color groc) a un compost anomenat formazan (de color blau). Aquesta reacció permet determinar la funcionalitat mitocondrial de les cèl·lules exposades a la mostra. El número de cèl·lules vives serà proporcional a la quantitat de formazan produït, i per conseqüència, serà proporcional a la intensitat de color blau de la mostra que es mesura

per espectrofotometria convencional a 550 i 620nm (Liu i Schubert 1997; Mosman, 1983).

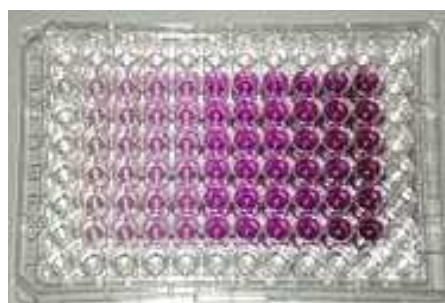


Figura 11. Imatge de la coloració de les mostres en el test MTT Assay

➤ Test de genotoxicitat o Comet Assay

El Comet Assay és un test bàsic per avaluar el dany a la cadena de DNA causat per agents clastogènics. Després d'exposar les cèl·lules als extractes de la mostra, es lisen les cèl·lules (amb Triton[®]), el DNA es sotmet a una migració electroforètica i posteriorment es tenyeix amb un fluorocrom i s'observa a microscopi de fluorescència. El material genètic que no s'hagi danyat, romandrà al mateix lloc representant una forma esfèrica, mentre que en el cas que s'hagin produït fragments de DNA, els fragments petits migraran produint una imatge semblant a la cua d'un cometa. Per tant, el dany a la cadena de DNA es quantificarà a partir del percentatge de fluorescència de la cua (ASTM, 2010).

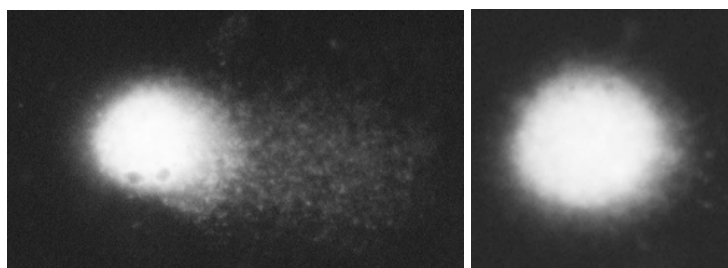


Figura 12. Test de genotoxicitat Comet Assay. A l'esquerre control positiu i a la dreta un control negatiu

2.4 Anàlisi estadística

L'anàlisi estadística s'ha realitzat mitjançant diferents versions del paquet estadístic SPSS per a Windows. S'ha realitzat la prova de *Levene* per a conèixer la homogeneïtat de les variàncies. Per a conèixer les diferències significatives entre paràmetres amb distribució normal s'han aplicat l'anàlisi de la variància (ANOVA) i posteriorment els tests de Tukey o Duncan. Per als paràmetres no paramètrics s'ha aplicat el test de Kruskal-Wallis i de Mann-Whitney. També, en alguns casos, s'han realitzat diagrames de caixa i correlacions de *Pearson* per associacions lineals i correlacions de *Spearman* tant per associacions lineals com no lineals entre els paràmetres. Les EC_{50} s'han calculat seguint models log-lineals.

Mitjançant el software de programació matemàtica Matlab R12 s'han realitzat mapes organitzatius o mapes de Kohonen (Self-Organizing Map - SOM) basats en una tècnica que permet agrupar les dades semblants sota un mateix patró que ressalta les relacions ocultes entre elles, per tal de facilitar la comprensió i visualització dels resultats, sobretot quan s'està davant d'un alt número de dimensions (Kohonen, 1984; 2000).

CAPÍTOL II

AIGÜES I SEDIMENTS FLUVIALS

Resum de l'Article

Nou enfoc per avaluar la contaminació per metalls pesants i l'estat ecotoxicològic dels sistemes aquàtics fluvials mitjançant mètodes de mostreig passiu.

Per tal d'avaluar la contaminació dels ecosistemes fluvials, fóra interessant analitzar tant els nivells de contaminació química de l'aigua i sediment, així com valorar l'ecotoxicitat d'aquests. En aquest capítol, es mostren els resultats d'un estudi desenvolupat durant l'hivern de l'any 2009 que consistí en mostrejar onze rius de Catalunya propers a àrees industrials i urbanes. S'analitzaren els contaminants de l'aigua tant a partir de mètodes convencionals de mostreig (presa de mostres puntuals d'aigua), com per mitjà de l'aplicació de mostrejadors passius d'aigua. Fent referència a aquest darrer sistema, es provà l'ús dels sistemes DGT (*Diffusive Gradient in Thin films*) per a aproximar-se a la fracció biodisponible de metalls presents en aigua, i també s'usaren els sistemes SPMDs (*Semi Permeable Membrane Devices*) per a aproximar-se a la fracció biodisponible de contaminants orgànics apolars. La concentració d'elements tòxics potencials (metalls i metal·loides) s'analitzà en aigua, aigua filtrada, DGTs i sediments. A més a més, es realitzen extractes orgànics i aquosos dels sediments, i extractes orgànics dels SPMDs per tal d'avaluar-ne l'ecotoxicitat aguda i crònica amb el bacteri *Vibrio fischeri* i l'alga d'aigua dolça *Pseudokirschneriella subcapitata* respectivament. El test d'ecotoxicitat Microtox[®] també s'aplicà als extractes dels dispositius DGTs. Els resultats d'aquest estudi posaren de manifest que el contingut de metalls dels rius catalans estava per sota dels límits marcats per la US EPA en aigües continentals, exceptuant en alguns rius pròxims a àrees industrials on els valors de mercuri, plom i zinc superaren aquests límits. Contràriament a l'observat en aigües, molts dels sediments mostrejats superaren en escreix els límits de zinc, arsènic, crom, plom, níquel, mercuri i manganès marcats per la US EPA per sediments fluvials. Aquest fet s'observà sobretot en punts de mostreig pròxims a àrees industrials. Finalment, s'obtingué una bona correlació entre els nivells de toxicitat obtinguts en els extractes de sediments i DGTs amb els nivells de metalls i metal·loides obtinguts en sediments. Els resultats d'aquest estudi recolzaren la idoneïtat de combinar els mètodes de mostreig convencionals amb mètodes de mostreig passiu per tal d'estudiar la contaminació i l'ecotoxicitat dels ecosistemes aquàtics continentals.

Novel approach for assessing heavy metal pollution and ecotoxicological status of rivers by means of passive sampling methods

*Neus Roig, Martí Nadal, Jordi Sierra, Antoni Ginebreda, Marta Schuhmacher,
José L. Domingo*

Publicat a Environment International(2011) 37: 671-677

ABSTRACT

In order to study the pollution of fluvial ecosystems, it is necessary to analyze not only the levels of chemical contaminants in water, but also those accumulated in the sediment matrix, as well as to assess its ecotoxicological status. Eleven Catalan (Spain) river sections (one sampling point per river) located near urban and industrial areas were sampled during winter of 2009. Water pollutants were collected by using passive samplers as Diffusive Gradient in Thin-Films (DGTs) and Semi-Permeable Membrane Devices (SPMDs). Point water samples were also collected. The concentrations of potentially toxic elements (PTE) in water, filtered water, DGTs and sediment samples were analyzed. Aqueous and organic solvent extracts of sediments samples and organic extracts of SPMDs were performed to assess acute toxicity to *Vibrio fischeri* by Microtox[®], and chronic toxicity to the green alga *Pseudokirschneriella subcapitata*. Microtox[®] test was also performed with DGT extracts. The results show that metals content of Catalan river waters are below the freshwater screening US EPA benchmarks, excepting some industrial areas (for Hg, Pb, and Zn). In contrast, sediments levels of some rivers were far above freshwater sediment screening US EPA benchmarks (for Zn, As, Cr, Pb, Ni, Hg, and Mn), particularly in the most industrialized areas. A good correlation was found between toxicity values of extracts (from sediments and DGTs) and PTE levels in sediments. The current results support the suitability of using combined point and passive sampling methods for assessing the chemical and ecotoxicological status of aqueous environments.

1. Introduction

Assessment of the state of river pollution requires analysis of chemical contaminants in both water and sediment compartments. Sediments integrate pollutant concentrations over the time, while water contaminants levels are more variable and dynamic (Ayyamperumal et al., 2006). Recently, different emerging methodologies for sampling such as water passive samplers, have been designed (Augulyte and Bergqvist, 2007; Tan et al., 2007). They allow the calculation of time-averaged concentrations for a period of time, avoiding fluctuations in the concentrations of the pollutants due to point discharges. They may be also used to detect micropollutants, element speciation, and for predicting the bioavailability of pollutants, allowing the determination of effective concentrations of pollutants that can bioaccumulate and/or cause toxicity. Diffusive Gradient in Thin-Films (DGTs) is a passive sampling method based on a layer of *Chelex* resin impregnated on hydrogel to accumulate metals. Target chemicals are all those ionic metals and species that are in labile equilibrium with those capable to bind to the binding agent. DGT measures both inorganic and labile organic species (Zhang, 2003), which are the bioavailable metal forms. In turn, Semi-Permeable Membrane Devices (SPMDs) consist on a membrane filled with triolein, which are designed to sample non-polar and hydrophobic compounds that are easily bioavailable for most organisms (Kočí et al., 2003; Augulyte and Bergqvist, 2007).

Although chemical analysis provides data about environmental concentrations, it gives little information about the on-site real toxicity. Toxicity depends on many factors, such as kind of pollutant and concentration, chemical species involved, environmental conditions, synergy between pollutants, etc. This information cannot be only assessed by analyzing pollutant concentrations. A novel application of passive samples is the use of extracts obtained from the elution of the sorption phase in bioassays to assess the ecotoxicity of accumulated pollutants, either non-polar or polar organic chemicals (Namiesnik and Szefer, 2009). Therefore, biological analyses combined with chemical analyses are essential to infer probable adverse biological effects (Chapman, 2007). Bioassays can partly provide this information. Different bioassays are being currently used, with a special emphasis on those based on microorganisms, which are time- and cost-effective for a rapid toxicity screening (Ocampo-Duque et al., 2008). Sediment microbial communities, especially bacteria, play an important role in nutrient cycling, organic matter decomposition, and pollutant

fate in aquatic sediments (van Beelen, 2003). In turn, algae are the most important primary producers in streams and rivers.

The purpose of the present study was to assess the pollution and ecotoxicological status of surface water compartments in Catalonia (NE of Spain) in river sections subjected to anthropogenic pressure. Samples of sediments and water of 11 rivers crossing urban and industrial areas were collected by two sampling methods: a) traditional point sampling (grab samples), and b) passive sampling with DGTs and SPMDs. The metal content of sediments, water and DGTs was determined, while the ecotoxicity of aqueous and organic extracts from sediments, DGTs, and SPMDs was evaluated with *Vibrio fischeri* and *Pseudokirschneriella subcapitata* inhibition tests. This study provides information on how using and interpreting data obtained from passive sampling technologies.

2. Materials and methods

2.1. Sampling site

Sampling was conducted in winter 2009 at 11 points located in selected river sections from Catalonia previously known as “hot spots” (Fig. 1). At each sampling site, a composite sediment sample was prepared by mixing 3 sub-samples collected at 0-5 cm depth. Point grab water samples were collected in a glass amber bottle. Total water and 0.45 μm - filtered water samples were both acidified at the collection time with HNO_3 (65% Suprapur, E. Merck, Darmstadt, Germany) at 0.1% of the total volume. In turn, DGTs (DGT Research, Lancaster, UK) were

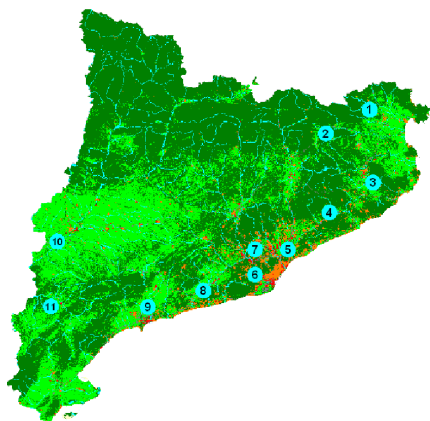


Figure 1. River sampling sites in the using land services map from Catalonia. Forest land in dark green; agriculture areas in light green; urban areas in orange; industrial areas in red. 1: Muga; 2: Fluvià; 3: Ter; 4: Tordera; 5: Besòs; 6: Infanta's Channel; 7: Llobregat; 8: Foix; 9: Francolí; 10: Segre, 11: Ebro.

deployed in triplicates at each location for 7 days. River water samples were collected twice: before and after the DGT deployment. For assessing the water toxicity associated to non-polar organic pollutants, an SPMD (ExposMeter, Tavelnsjö, Sweden) was installed at the same sites for 21 days. Samples were stored at 4 °C prior to analyses. The volume of sampled water volume (L) passed through the SPMDs during 21 days was calculated by using performance reference compounds (PRC). For it, concentrations of d₁₀-fluorene and ¹³C₁₂-PCB-37 were determined at the end of the collection and compared with the levels spiked prior to the deployment (Kočí et al., 2003). Specifications on how to calculate SPMD-based water volumes have been reported elsewhere (Augulyte and Bergqvist, 2007).

2.2. Chemical analysis

The levels of pH, temperature and dissolved oxygen in water were determined twice. The Potentially Toxic Elements (PTE) considered in this study were arsenic (As), cadmium (Cd), chromium (Cr), mercury (Hg), manganese (Mn), nickel (Ni), lead (Pb), vanadium (V), and zinc (Zn). After grinding, sediments were digested in Teflon bombs with HNO₃ (65% Suprapur, E. Merck, Darmstadt, Germany) for 8 h, and heated for 80°C for 8 additional hours (Nadal et al., 2004), while the resin layer of the DGT was placed with HNO₃ 1M overnight (Zhang, 2003). After this, PTE concentrations were quantified by inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES) (Mn and Zn), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (As, Cd, Hg, Ni, Pb, and V), or atomic absorption spectrometry (AAS) (Cr). Water metal concentrations were calculated as reported by Zhang (Zhang, 2003). Finally, samples of water (W) and filtered water (FW) were acidified and the levels of metals were also determined by ICP-OES and ICP-MS (Ocampo-Duque et al., 2008). Detection limits are shown in Table 1.

Table 1
 Detection limits of metal content in water (W), filtered water (FW), DGTs and sediments.

	As	Cd	Cr	Hg	Mn	Ni	Pb	V	Zn
W and FW (µg/L)	0.03	0.04	0.02	0.01	0.17	0.16	0.20	0.01	2.15
DGTs (µg/L)	0.05	0.02	0.10	0.10	0.05	0.10	0.02	0.05	0.10
Sediments (mg/kg)	0.10	0.025	0.25	0.10	0.025	0.10	0.025	0.25	0.25

2.3. Sample preparation for ecotoxicological analysis

To assess the sediment toxicity, aqueous and organic solvent extracts of sediment samples were performed to discern between toxicity coming from polar and non-polar pollutants. Aqueous elutriates of sediments were obtained by mixing 10 g of wet sediment with 20 mL of 2% NaCl solution shaking during 12 h, and finally filtering on 0.47 μm pore diameter membrane filters (Ocampo-Duque et al., 2008). Organic extraction of sediments was performed according to the US EPA 3546 method. Solvent mixtures were filtered, evaporated, and the remaining residue dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO). Although SPMDs are generally easier to be analyzed than other environmental matrices, analysis of contaminants retained in SPMDs and its toxic effects can be affected by the presence of polyethylene waxes, oleic acid and methyl oleate evolved from sampling devices (Huckins et al., 2002). Since many solvents are toxic to target organisms (Kočí et al., 2004), the choice of a suitable solvent is very important for ecotoxicity analysis. In order to evaluate which solvent was the least toxic to *Vibrio fischeri*, preliminarily whole SPMDs were dialyzed with different solvents: n-hexane, cyclohexane, cyclohexane:dichloromethane (9:1). Results showed that n-hexane was the least toxic (EC_{50} = 1.66 μL of DMSO/mL test solution), followed by the mixture of cyclohexane:dichloromethane (EC_{50} = 0.08 μL of DMSO/mL test solution) and cyclohexane (EC_{50} = 0.04 μL of DMSO/mL test solution).

Aqueous extracts of sediments were directly used for the toxicity bioassay, while organic extracts of SPMDs and sediments were evaporated and the remaining residue dissolved in dimethyl sulphoxide (DMSO). DGT acid extracts were neutralized with NaOH prior to assess its toxicity.

2.4. Toxicity tests

Microtox[®] acute bioassay using Model 500 Analyser (SDI, USA) with *Vibrio fischeri* and chronic toxicity test to the green alga *Pseudokirschneriella subcapitata*, were determined by following the ISO 11348-1:2007 norm and the OECD 201 method, respectively. Table 2 shows the entire toxicity test methods used in this study. Because there is not a general approach, one of the main difficulties to interpret toxicity assays is how to express these results and how establish toxicity criteria according to toxicity results. In this study, *Vibrio fischeri* EC_{50} was expressed as μg gel DGT/ml Microtox

diluent, for DGT extracts; L/ml Microtox diluent, for SPMD extracts; and mg sediment/ml aqueous extract and mg sediment/ml Microtox diluent, for aqueous and organic extracts of sediments, respectively. *Pseudokirschneriella subcapitata* EC₅₀ was expressed as L/ml algae solution, for SPMD extracts, and mg sediment/ml aqueous extract and mg sediment/ml algae solution, for aqueous and organic extract of sediments, respectively. In addition, a toxicity classification for comparison purposes was developed based on Bombardier and Bermingham (1999) and Johnson et al. (2004). Toxicity Index (TI) was calculated by comparing the blank's mean EC₅₀ value with each EC₅₀ value for each toxicity test. Four toxicity ranges were established according to the following selected ranges: “non-toxic” (TI<1), “marginally toxic” (TI=1-4.9), “moderately toxic” (TI=5-9.9) and “highly toxic” (TI>10).

Table 2
 Ecotoxicity tests and corresponding methods.

Sample	Extraction method	Target organism	Method
DGTs	Resin layer Desorption with HNO ₃ 1M and neutralized with NaOH	<i>Vibrio fischeri</i>	Microtox® Basic Test
		<i>Vibrio fischeri</i>	Microtox® Basic Test
SPMDs	Extraction with n-hexane, evaporated and remaining residue dissolved in DMSO	<i>Pseudokirschneriella subcapitata</i>	OECD 201 Method (for aqueous and organic extracts)
Sediments	Aqueous extract with 1:2 (w:vol) dilution of sediment and NaCl 2%	<i>Vibrio fischeri</i>	Microtox® 90% Aqueous Extracts Test (for aqueous extracts)
	Organic Extract: extraction as US EPA Method 3546 and remaining residue dissolved in DMSO	<i>Pseudokirschneriella subcapitata</i>	Microtox® Basic Test (for organic extracts) OECD 201 Method (for aqueous and organic extracts)

2.5. Statistics and data processing

Pearson correlation analysis between the concentrations of metals in different matrices and toxicity results was performed with SPSS Statistics 17.0. Because of the high amount of results obtained, a special kind of artificial neural network (ANN), Kohonen's Self Organizing Maps (SOM), was applied to the whole set of data. Because of its capabilities, SOM is a “data mining” multivariate technique whose use has been

continuously increasing for environmental data analysis (Nadal et al., 2006; Alvarez-Guerra et al., 2008).

3. Results and discussion

3.1. Physico-chemical properties of water and sediments

Most water samples showed mild alkaline pH values (range: 7.8-8.7), and high dissolved oxygen concentrations (range: 7-12 mg/L), while in sediments pH ranged 6.8-7.9. Specific results of these parameters are shown in Table 3.

Table 3
Physical parameters of water and sediments.

River	Water			Sediments		
	O ₂ (mg/L)	pH	Temp.	pH	Temp.	pH
		DGT set up	DGT removing			
Muga	7.33 ± 0.05	8.2 ± 0.3	13.8 ± 0.1	8.1 ± 0.1	9.1 ± 0.3	7.9 ± 0.4
Fluvià	12.88 ± 0.13	8.4 ± 0.0	9.1 ± 0.0	8.6 ± 0.1	5.7 ± 0.0	6.8 ± 0.1
Ter	8.65 ± 0.09	7.8 ± 0.1	10.1 ± 0.3	8.4 ± 0.1	9.2 ± 0.1	6.9 ± 0.0
Tordera	11.59 ± 0.07	7.9 ± 0.0	10.9 ± 0.0	8.0 ± 0.0	10.6 ± 0.1	7.6 ± 0.1
Besòs	8.80 ± 0.10	9.0 ± 0.0	15.0 ± 0.1	7.9 ± 0.0	15.3 ± 0.1	6.8 ± 0.2
Infanta's C.	6.50 ± 0.09	8.1 ± 0.1	16.9 ± 0.1	8.5 ± 0.0	13.4 ± 0.1	7.0 ± 0.1
Llobregat	9.92 ± 0.18	8.3 ± 0.1	11.9 ± 0.0	8.3 ± 0.0	14.4 ± 0.1	6.9 ± 0.1
Foix	8.68 ± 0.05	8.3 ± 0.1	11.3 ± 0.0	8.3 ± 0.0	9.6 ± 0.0	6.9 ± 0.0
Francolí	10.75 ± 0.10	8.6 ± 0.0	14.6 ± 0.1	8.8 ± 0.0	11.7 ± 0.0	7.2 ± 0.0
Segre	9.3 ± 0.09	8.4 ± 0.1	11.4 ± 0.3	8.4 ± 0.2	12.6 ± 0.2	7.4 ± 0.0
Ebre	8.80 ± 0.13	8.2 ± 0.1	10.8 ± 0.5	8.5 ± 0.0	11.4 ± 0.1	7.2 ± 0.0

Infanta's C. : Infanta's channel. Temp.: temperature

3.2. Potentially toxic elements in river waters

The concentrations of PTEs in different aqueous compartments (total water, filtered water, DGTs, and sediments) are given in Table 4. In general terms, the highest concentrations were found in waters from the Infanta's Channel and Besòs River, both located in the metropolitan area of Barcelona. Sediments from the same sites also presented the highest levels of PTEs. The conventional practice of distinguishing "dissolved" and "total" metal concentrations with the analysis of sediments provides valuable information regarding the distribution of the pollutants, pollutants fate and toxicity. Moreover, it allows predicting hypothetical scenarios in case of floods, which

are quite usual in Mediterranean rivers. The tendency of PTEs to remain in the soluble fraction or adsorbed to the suspended material depends fundamentally on the element and the predominant chemical species, as well as its affinity for the suspended solids. Generally, particulate materials in natural waters consist predominantly of detrital particulate and colloidal organic matter, inorganic solids such as metal oxides and hydroxides (e.g., SiO_2 , MnO_2 , FeOH , Al_2O_3), algal skeletal remains, detrital carbonate and aluminosilicates (eg, clay minerals, feldspars) (Johnson et al., 2004). In filtered water, metals may be either in ionic form or free, forming complex soluble organic (fulvic and humic acid, etc.), or also as inorganic solids forming colloidal size $<0.01\text{-}10\ \mu\text{m}$ (Stumm and Morgan, 1981).

The current results show that those elements, which are probably in the cationic form, are more abundant in the particulate fraction, taking into account river conditions (pH and dissolved oxygen) and Pourbaix diagrams (Eh-pH) in water (Takeno, 2005). Among them, Zn (Zn^{2+}), Mn (Mn^{2+}), Ni (Ni^{2+}) and Pb ($\text{Pb}(\text{OH})^+ / \text{Pb}^{2+}$), with an average percentage in the solid fraction of 33-44%, 30%, 22-34% and 42-55%, respectively. Contrastingly, those elements essentially forming anionic species such as As (HASO_4^{2-}) and V ($\text{H}_2\text{VO}_4^- / \text{HVO}_4^{2-}$), are present in the filterable fraction in more than 90% of the elements.

In the special case of Cr, it predominates in the particulate phase, while in others it tends to be solubilized. This element, on thermodynamics basis, should be considered as hexavalent chromium in our rivers conditions (alkaline media and oxidizing conditions) (Nriagu and Nieboer, 1988), being CrO_4^{2-} (soluble and highly toxic) the predominant chemical species. However, Cr in natural waters is often present in its two stable oxidation states: Cr (III) and Cr (VI). The presence and ratio between these two forms depend on various processes, which include chemical and photochemical *redox* transformation, precipitation/dissolution and adsorption/desorption reactions (Rai et al., 1989; Kotas and Stasicka, 2000).

Cr (III) (forming aqua / hydroxo complexes) is usually very insoluble. However, it exhibits a tendency to form many different complexes with naturally occurring organic material. The trend to be adsorbed by naturally occurring solids contributes to decrease Cr (III) mobility and bioavailability in waters. In contrast to Cr (III) complexes, Cr (VI) species are only weakly sorbed to inorganic surfaces, being the most mobile form of Cr in the environment (Kotas and Stasicka, 2000). Dissolved Cr concentrations in unpolluted freshwater were normally lower than $2\ \mu\text{g/L}$. Higher concentrations have

been reported in rivers affected by municipal and industrial discharges (Pawlisz et al., 1997). In the current study, this value was only exceeded in 2 rivers (Besòs and Infanta's Channel), being the soluble fraction the predominant form, which may indicate hexavalent oxidation state and anthropogenic origin. Further studies regarding Cr speciation were not carried out, as they were out of the scope of the present investigation. The concentrations of Hg, which tends to form very insoluble species (HgO), were very low, and this element only could be detected in few sampling points. When comparing with the guidelines, the polluting charge of Catalan river waters seemed to be low, with most PTE levels being for most samples below the freshwater screening US EPA benchmarks (US EPA, 2007) (Table 5). Some exceptions were found in some specific sites, such as Ter River (Pb), and Besòs River and Infanta's Channel (As) (Table 4).

The presence of metals in the unfiltered water does not imply that these are entirely in bioavailable forms. Bioavailability studies indicate that the aquatic organisms uptake of free metal ions (metal hydroxides) from solution is more efficient than direct particulate matter ingestion (Luoma, 1983). The Diffusive Gradient in Thin-Film (DGT) was proposed by Davison and Zhang, (1994) as an alternative speciation device that measures the free metal ion and labile complexes. The diffusion process detects free ions or weakly bound complexes able to migrate to the resin layer. This is analogous to migration across a cell membrane. Therefore, DGT-labile metal concentrations may represent the bioavailable metal fraction more closely than filterable metal or total metal. DGT measurements are thus assumed to provide, directly, the effective bioavailable metal concentration for the worst possible biological situation for fast membrane transport (Zhang and Davison, 1999).

With respect to DGT results, As, V and Hg practically did not sorb to DGT devices. Low Pearson correlation values between DGT values and filterable fraction were found. The high radium charge ratio of the As and V anions probably makes them unlikely to be adsorbed by anionic exchange. Moreover, *Chelex* resin is more suitable for cationic exchange. For the absorption of anionic species, ferrihydrite gels might be more suitable (Zhang and Davison, 1999). Dočekalová and Divis (2005) reported that Hg ions are covalently bound to amide nitrogen groups of commonly used polyacrylamide gels, which makes them unsuitable as a diffusive medium. Among cations, Pb is the most absorbable. Together with Ni, Zn and Mn, Pb correlates better with the total and filterable water values ($p < 0.01$; $r > 0.55$). Concerning Cd, DGT devices allowed

detection of this element in all samples. It was also observed by Sherwood et al. (2009) in marine waters.

Chromium can form cations (Cr III) and anions (Cr VI). The DGT response to Cr (III) species is based on the diffusion of labile Cr species from the medium through a polyacrylamide gel and the binding of Cr (III) in a gel layer containing the cation-exchange resin Chelex-100. The response of Cr (VI) species is only based on equilibration. Equilibrium is reached when the concentration of Cr (VI) in the diffusive gel equals the concentration in solution (Giusti and Barakat, 2005). Therefore, DGTs allow the absorption of different oxidation states forms of Cr in natural waters. An interesting fact is that those samples in which soluble Cr was high (Besòs River and Infanta's Channel), DGT values were low, which is probably due to the fact that Cr was in its soluble oxidation state (VI). These soluble Cr chemical forms are usually spilled by metallurgical and metal finishing industries (Nriagu and Nieboer, 1988), which are often located in the surrounding areas of those rivers. Moreover, DGT measurements of Cr in other rivers seemed to be higher, probably because it forms Cr (III) species that have more affinity for the binding phase (cationic exchange). There was a sampling point where DGT measured concentrations of Cr were particularly high, Fluvià River. This river passes through a town (Olot) where textile and tannery industries are present. The wastewaters of this type of industries usually contain high concentrations of Cr (III) (Nriagu and Nieboer, 1988). In summary, metal adsorption in DGT devices compared to metal content in filtered water decreased as following: $Pb \gg Cr > Cd > Ni \sim Zn > Mn \gg V \sim As \sim Hg$. The DGT measurements showing more similar results compared to soluble fraction were Ni, Zn and Mn.

When comparing DGT measurements with US EPA freshwater screening benchmarks (US EPA, 2005), only As, Zn and Mn concentrations were close to threshold values, especially in Infanta's Channel. Lead was the only element exceeding that threshold ($2.5 \mu\text{g/L}$) in most cases. Therefore, DGT measurements might have overestimated Pb levels.

3.3. Potentially toxic elements in sediments

As expected, metal contents in sediments were much higher than in waters (Table 4), demonstrating that sediments are both sink and potential source of contaminants to the water column. Levels in Ter, Tordera, Foix and Segre Rivers did not exceed any

threshold value. Nevertheless, PTE levels in some places were high enough to be considered contaminated sediments, particularly in industrialized and urban areas. Concentrations above the US EPA benchmarks (US EPA, 2006) were observed in Besòs River (Zn, Mn, As, Cr, Ni, Pb and Hg) and Llobregat River (Zn and Ni), both in the metropolitan area of Barcelona, Francolí River (Zn and Pb), which crosses the petrochemical area of Tarragona, the Ebro River (Hg), near a chlor-alkali plant, and the Fluvià River (Zn and Mn). Some significant correlations were observed between the metal concentrations in sediments and those found in other compartments such as DGTs (Zn, Ni, $p < 0.01$, $r > 0.5$; Mn, $p < 0.05$, $r > 0.5$) and water (Zn, As, Cr, V, and Ni, $p < 0.01$, $r > 0.5$), as well as filtered water (As, Cr, Ni, V, and Zn, $p < 0.01$, $r > 0.5$; Hg and Mn, $p < 0.05$, $r > 0.5$).

Table 4

Potentially Toxic Elements (PTE) in total water (W), filtered water (FW), Diffusive Gradient in Thin-Films (DGT) (in µg/L), and in sediment samples (SED) (in mg/kg).^a

Sample Site		As	Cd	Cr	Hg	Mn	Ni	Pb	V	Zn
Muga	W	1.76± 0.19	ND	0.12±0.08	ND	25.6±2.8	1.01±0.68	4.24±2.02	0.78±0.15	22.48±16.33
	FW	1.73±0.16	ND	0.23±0.00	0.04±0.01	19.6±6.1	0.68±0.07	1.65±0.42	0.74±0.04	9.34±2.17
	DGT	ND	0.03±0.02	0.80±0.48	ND	7.9±1.4	1.01±0.07	7.00±5.86	0.02±0.00	7.74±2.12
	SED	1.09	0.04	2.83	ND	113.5	2.57	3.41	5.17	16.17
Fluvià	W	0.79±0.26	ND	0.42±0.19	ND	32.3±7.1	2.54±0.18	1.41±1.49	2.06±0.14	15.31±6.50
	FW	0.66±0.04	ND	0.22±0.06	0.02±0.03	5.8±1.1	0.43±0.11	ND	1.66±0.89	6.42±0.27
	DGT	ND	0.20±0.05	26.58±2.59	ND	2.0±0.4	1.40±0.03	13.23±4.40	0.06±0.05	7.40±7.01
	SED	5.46	0.21	21.14	ND	463.4	21.59	21.72	20.00	132.31
Ter	W	2.08± 0.12	ND	0.33±0.04	ND	35.8±4.1	2.40±0.97	5.40±2.40	0.91±0.06	18.37±11.06
	FW	1.97±0.14	ND	0.20±0.01	ND	29.2±0.6	3.10±0.20	5.53±3.43	0.82±0.07	11.26±4.19
	DGT	ND	0.15±0.09	2.25±0.94	ND	23.7±6.9	1.08±0.07	35.18±0.34	0.02±0.00	13.22±4.35
	SED	4.77	0.26	18.80	ND	273.8	19.76	24.51	12.06	120.91
Tordera	W	0.70± 0.06	ND	0.10±0.05	ND	66.8±3.3	2.59±0.37	0.47±0.00	0.84±0.11	5.09±2.37
	FW	0.64±0.05	ND	0.04±0.01	ND	63.1±7.6	1.35±0.20	ND	0.75±0.06	5.00±0.35
	DGT	ND	0.04±0.01	0.26±0.06	ND	39.2±5.5	1.46±0.03	9.31±7.90	0.06±0.02	2.43±0.84
	SED	0.77	0.05	3.24	ND	266.5	3.07	5.09	8.36	36.04
Besòs	W	4.41±0.36	0.04±0.00	2.89±0.60	0.02±0.01	114.8±2.5	23.28±4.28	1.44±0.02	2.81±0.24	30.06±4.21
	FW	4.28±0.18	ND	2.35±0.55	0.02±0.01	114.9±1.9	18.72±0.45	0.56±0.08	2.78±0.21	22.71±0.21
	DGT	ND	ND	0.16±0.01	ND	41.3±0.5	5.26±0.09	2.78±0.02	0.03±0.00	4.98±0.24
	SED	12.10	0.68	76.76	0.45	470.5	45.63	61.98	34.59	333.77
Infanta's Channel	W	4.54±0.01	ND	6.08±0.15	ND	113.6±9.1	14.65±0.19	2.45±0.27	2.55±0.24	127.4±6.8
	FW	4.17±0.07	ND	3.95±0.94	ND	109.7±2.8	13.00±0.70	0.72±0.10	2.48±0.11	96.38±17.43
	DGT	ND	0.06±0.05	0.30±0.03	ND	62.0±4.6	3.69±0.34	16.17±12.81	0.02±0.00	36.63±2.78
	SED	13.17	0.64	74.86	0.61	516.0	31.36	42.16	20.80	556.29

^aW, FW and DGT concentrations are given as mean ± standard deviation; SED levels are given as point values. ND: Not detected.

Table 4. Cont.

Sample	Sample	As	Cd	Cr	Hg	Mn	Ni	Pb	V	Zn
Llobregat	W	1.56±0.13	ND	0.32±0.01	ND	40.6±3.0	4.17±0.15	1.03±0.14	2.09±0.20	8.72±2.73
	FW	1.48±0.18	ND	0.08±0.03	ND	26.3±5.7	1.38±0.29	0.93±0.57	2.05±0.32	6.35±1.28
	DGT	ND	0.07±0.05	0.17±0.01	ND	37.7±8.5	0.98±0.03	9.23±5.30	0.02±0.00	5.68±1.64
	SED	8.16	0.35	18.53	ND	456.9	23.57	22.63	14.90	127.40
Foix	W	2.02±0.19	ND	0.42±0.07	ND	32.1±7.8	3.94±0.26	0.61±0.00	2.11±0.21	25.30±2.74
	FW	1.97±0.27	ND	0.39±0.08	ND	30.7±7.3	3.19±0.29	0.57±0.18	2.14±0.19	25.59±0.43
	DGT	0.05±0.03	ND	0.18±0.01	ND	16.1±3.9	1.05±0.53	3.15±0.59	0.03±0.01	8.68±7.84
	SED	5.91	0.28	13.25	0.10	281.7	13.07	34.24	12.07	115.18
Francolí	W	2.43±0.02	ND	0.67±0.08	ND	11.5±2.0	0.89±0.02	0.53±0.00	1.67±0.15	4.63±0.00
	FW	2.45±0.08	ND	0.59±0.02	ND	6.49±1.18	0.88±0.16	0.26±0.15	1.65±0.07	4.31±1.14
	DGT	ND	ND	0.17±0.02	ND	3.36±1.79	0.98±0.14	2.95±0.99	0.01±0.01	1.63±0.84
	SED	6.87	0.32	24.68	ND	302.5	15.65	40.20	17.43	130.05
Segre	W	1.24±0.09	ND	0.14±0.05	ND	13.18±1.25	1.13±0.06	1.26±0.08	0.57±0.07	21.24±3.20
	FW	1.21±0.3	ND	0.03±0.01	ND	5.06±0.83	2.09±0.23	0.23±0.01	0.48±0.01	8.13±0.12
	DGT	ND	0.03±0.01	0.18±0.01	ND	2.20±0.52	1.05±0.02	3.05±0.13	0.01±0.00	1.68±0.57
	SED	5.87	0.21	11.55	ND	339.5	13.17	12.42	11.62	66.93
Ebro	W	0.99±0.08	ND	0.37±0.02	ND	5.62±0.15	0.79±0.05	1.59±0.06	0.69±0.01	10.47±1.59
	FW	0.95±0.07	ND	0.24±0.02	ND	2.79±0.09	0.65±0.03	ND	0.66±0.05	4.29±0.92
	DGT	ND	0.03±0.01	0.18±0.00	ND	1.67±0.38	1.95±0.07	3.15±0.24	0.01±0.00	7.28±1.42
	SED	4.89	0.18	8.84	0.22	218.8	11.88	16.35	10.20	40.16

^aW, FW and DGT concentrations are given as mean ± standard deviation; SED levels are given as point values. ND: Not detected.

Table 5
 US EPA Benchmarks.

	Freshwater (µg/L)	Sediment (mg/kg)
As	5.00	9.80
Cd	0.25	0.99
Cr	85.00	43.40
Hg	0.03	0.18
Mn	120.0	460.00
Ni	52.00	22.70
Pb	2.5	35.80
V	20.00	-
Zn	120.00	121.00

3.4. Water toxicity

The combination of chemical and ecotoxicological methods has proven to be very useful for the characterization of river pollution and ecotoxicity. We should mention that all filtered river water samples were not toxic using the bioassays of Microtox® and algae. For this reason, extracts of passive samplers were used to assess the relative toxicity between river waters. DGTs seem to be a tool of utility for water sampling in order to avoid concentrations fluctuation, especially coming from point discharges. The toxicity due to the PTE absorbed in DGT devices was assessed by the Microtox® bioassay (Table 6). No toxicity was observed for the Muga River, showing the lowest contaminant load. River points with highest toxicities were those corresponding to Ebro River and Infanta's Channel. Fluvià River, which had abnormally high values of Cr accumulated in the DGT, was proved to have "marginal toxicity", pointing out to the fact that Cr remains as Cr III (low toxicity). A good correlation was found between DGT extracts toxicity and toxicity of aqueous extracts of sediments for luminescent bacteria and sediment organic extracts for algae ($p < 0.01$; $r > 0.5$). Very limited information about DGT-associated toxicity is currently available, which makes difficult comparisons with other studies. SPMD method of passive sampling is a very good tool for the assessment of water environment, especially for monitoring substances inhibiting aquatic species (Kočí et al., 2004). In relation to SPMD extracts, which allow assessing the toxicity derived from lipophilic pollutants, a low toxicity was noted for the

Muga River in both bioassays. For the Microtox[®] bioassay, the samples collected in the Besòs River, Ter River and Infanta's Channel were those showing a higher toxicity, whereas for algae assay samples from Francolí River and Infanta's Channel were the most toxic. With regard to the two target organisms, *Vibrio fischeri* seemed to be more sensitive than *Pseudokirschneriella subcapitata*. A good correlation was found between toxicity of SPMD extracts by Microtox and toxicity of organic extracts of sediments for both assays. This clearly shows that it is important to study together the toxicity associated to non-polar contaminants in water and sediments.

3.5. Sediment toxicity

Microtox[®] aqueous extracts from sediments were “non-toxic” in nearly all cases, while algae test showed “moderate toxicity” for Infanta's Channel, probably due to its high PTE content, and being “marginally toxic” for most sediment samples. This could be due to washing effects in surface sediments and the subsequent lower soluble fraction of toxic substances. However, sediment aqueous toxicity for both bioassays correlated positively with DGT extracts toxicity ($p < 0.01$; $r > 0.5$). On the other hand, organic extracts, which may contain apolar pollutants that are adsorbed in the sediment matrix and unlikely washable, showed a higher toxicity. This was also noted by Ocampo-Duque et al. (2008) when studying sediments from the Ebro River. The organic extracts of most samples were classified as “moderately and marginally toxic”, being two of them - Infanta's Channel and Besòs River - classified as “highly toxic” in two criteria (Bombardier and Bermingam, and TI). Good correlation ($p < 0.01$; $r > 0.5$) was found between sediment aqueous extract toxicity in algae and Zn, As, Cr, Cd and Hg, as well as between sediment organic extract toxicity for algae and Zn, Cr, Ni, Cd and Hg levels ($p < 0.01$; $r > 0.5$). This is probably due to organic contaminants or organometals compounds soluble in organic medium. Moreover, good correlations were found between *V. fischeri* toxicity of SPMD organic extracts and sediment toxicity ($p < 0.01$; $r > 0.5$). Although sediments presented high levels of PTE, toxicity would be more related to the presence of lipophilic compounds and soluble organo-metals in organic solvents. In general terms, for organic extracts bacteria tests were more sensitive than those with algae. In contrast with other studies where more acidic waters were studied (Wang et al., 2009), no correlation was found between sediment aqueous extracts toxicity and its pH.

The fact that toxicity values were not associated to punctual river water samples, together with the good correlations between the toxicity derived from passive sampler extracts and sediment extracts, shows the importance of water passive sampling methods to assess the ecotoxicity of fluvial systems.

Table 6
 Ecotoxicity results.

	DGTs		SPMDs				Sediments							
	<i>Vibrio fischeri</i>		<i>Vibrio fischeri</i>		<i>Pseudokirschneriella subcapitata</i>		<i>Vibrio fischeri</i>				<i>Pseudokirschneriella subcapitata</i>			
	μ l gel DGT/ml McTx Diluent	TI	L/ml McTx Diluent	TI	L/ml algae solution	TI	Aqueous extract		Organic Extract		Aqueous extract		Organic Extract	
							mg sed/ml aqueous extract	TI	mg sed/ml McTx diluent	TI	mg sed/ml aqueous extract	TI	mg sed/ml algae solution	TI
Muga	2.00 [0.83-3.96]	0.9	18.9 [10.1-25.4]	1.6	200.4 [153.2-252.0]	0.8	>1000	1	0.24 [0.14-0.43]	2.4	445.9 [331.1-550.7]	1.1	30.0 [15.8-47.8]	0.5
Fluvià	0.77 [0.26-2.29]	2.3	9.2 [5.3-16.0]	3.2	93.6 [53.1-113.2]	1.8	>1000	1	0.77 [0.33-1.81]	0.8	524.4 [475.8-590.4]	1	41.9 [15.9-54.4]	0.4
Ter	0.64 [0.30-1.49]	2.9	6.8 [2.2-10.7]	4.3	93.5 [54.8-174.8]	1.8	>1000	1	0.15 [0.08-0.27]	3.8	358.0 [254.1-456.6]	1.4	2.3 [0.1-11.4]	6.3
Tordera	0.44 [0.13-1.43]	4.2	37.4 [23.2-60.2]	0.8	187.7 [116.1-208.1]	0.9	>1000	1	2.20 [2.11-2.28]	0.3	472.8 [370.6-573.5]	1.1	13.1 [1.2-38.2]	1.1
Besòs	0.49 [0.16-1.22]	3.6	5.3 [2.5-11.1]	5.6	197.2 [156.0-223.2]	0.9	>1000	1	0.04 [0.02-0.06]	16	360.0 [309.2-421.0]	1.4	3.0 [1.7-5.8]	5
Infanta's Channel	0.40 [0.19-0.93]	4.6	7.5 [4.2-13.5]	3.9	87.7 [56.3-128.7]	1.9	>1000	1	0.05 [0.04-0.08]	11	70.0 [24.8-103.1]	7.1	3.1 [1.7-17.5]	4.7
Llobregat	0.99 [0.38-2.30]	1.8	8.5 [3.9-18.5]	3.4	91.8 [51.4-120.7]	1.8	>1000	1	0.73 [0.17-2.17]	0.8	577.9 [527.0-617.6]	0.9	42.8 [13.3-48.5]	0.3
Foix	0.68 [0.25-1.13]	2.7	11.3 [4.8-26.5]	2.6	161.3 [50.1-254.7]	1	>1000	1	0.65 [0.50-0.86]	0.9	339.7 [280.7-528.0]	1.5	51.9 [12.4-66.7]	0.3
Francolí	0.49 [0.28-0.75]	3.8	22.9 [15.9-33.0]	1.3	86.1 [66.4-119.9]	2	>1000	1	1.24 [0.41-1.75]	0.5	301.5 [226.0-378.1]	1.7	29.0 [11.6-41.1]	0.5
Segre	0.65 [0.18-1.17]	2.8	14.8 [5.6-29.2]	2	155.4 [84.6-162.0]	1.1	>1000	1	0.26 [0.15-0.46]	2.2	326.0 [290.8-388.6]	1.5	45.0 [28.7-66.9]	0.3
Ebro	0.23 [0.03-1.52]	7.9	12.5 [3.5-25.3]	2.3	101.3 [52.3-147.1]	1.7	595.0 [376.6-704.9]	1.7	0.23 [0.08-0.65]	2.5	174.0 [158.7-196.9]	2.9	10.3 [2.7-18.0]	1.4

TI: Toxicity Index. Values between parentheses correspond with toxicity range observed.

3.6. *Self-Organizing Maps (SOM)*

To study the relationship among the chemical parameters in the toxicity results, a SOM algorithm was applied. A rectangular grid of 20 units (5 x 4) was built. The learning and tuning phases consisted of 10,000 steps each. The resulting Kohonen's map, together with the associated component planes (c-planes), are shown in Fig. 2. Four clusters were detected. The first two clusters would correspond to points located in Besòs River and Infanta's Channel, which presented in general terms, higher PTE concentrations in DGT, filtered water and sediments, as well as higher toxicity values. These increases would be correlated with the strong anthropogenic impact that both rivers suffer, as a result of the important presence of industrial and wastewater treatment facilities located in their riverside. On the other hand, the remaining two clusters grouped some sampling sites whose levels would be more related to the natural presence of metals in the environment, in general, and in soils in particular. The third cluster included points of Muga, Tordera, Fluvià, Ter and Llobregat Rivers, all of them located at the North of Catalonia. By contrast, the fourth cluster grouped points located in the Segre, Ebre, Foix and Francolí Rivers, situated at the South of the sampling area. It has been previously seen that soils from different regions of Catalonia present a high variation of their properties and geologic materials. This difference could explain the separation of those 9 rivers in 2 different clusters.

In the current study, it has been stated that the toxicity associated to passive samplers and sediment samples allows screening a global approach of the ecological status of the fresh waters, when comparing mean toxicity indexes. When applied to stressed sections of 11 Catalan rivers, the Muga River showed the lowest TI score, being therefore considered as "non-toxic". It contrasts with Besòs River and Infanta's Channel, which were "moderately toxic". The remaining river sections were under the category of "marginally toxic". Passive sampling methodologies have been proven to give additional information to that from point water samples, which present a high dilution of pollutants. Furthermore, these techniques allow assessing the toxicity of the bioavailable pollutant fraction for both PTE (DGTs) and lipophilic organic compounds (SPMDs).

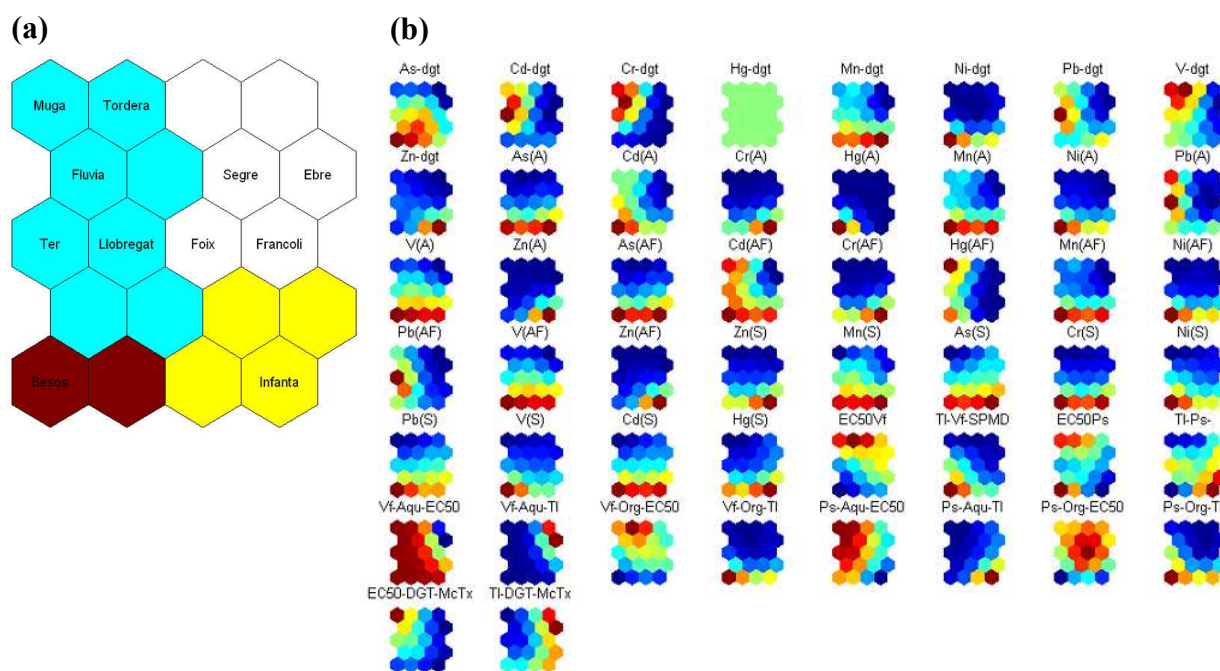


Figure 2. SOM results for PTE concentrations in DGT (dgt), water (A), filtered water (AF), sediments (S), and ecotoxicological values of 11 Catalan rivers: (a) Kohonen's map, and (b) Component planes: metal content in DGTs: As-dgt, Cd-dgt, Cr-dgt, Hg-dgt, Mn-dgt, Ni-dgt, Pb-dgt, V-dgt, Zn-dgt; metal content in total water: As(A), Cd(A), Cr(A), Hg(A), Mn(A), Ni(A), Pb(A), V(A), Zn(A); metal content in filtered water: As(AF), Cd(AF), Cr(AF), Hg(AF), Mn(AF), Ni(AF), Pb(AF), V(AF), Zn(AF); metal content in sediments: Zn(S), Mn(S), As(S), Cr(S), Ni(S), Pb(S), V(S), Cd(S), Hg(S); EC₅₀ and TI of SPMDs by *V.fischeri*: EC₅₀Vf and TI-Vf-SPMD; EC₅₀ and TI of SPMDs by *P.subcapitata*: EC₅₀Ps and TI-Ps; EC₅₀ and TI of aqueous and organic extracts of sediment by *V.fischeri*: Vf-Aqu-EC₅₀, Vf-Aqu-TI, Vf-Org-EC₅₀ and Vf-Org-TI respectively; EC₅₀ and TI of aqueous and organic extracts of sediments by *P.subcapitata*: Ps-Aqu-EC₅₀, Ps-Aqu-TI, Ps-Org-EC₅₀ and Ps-Org-TI respectively; EC₅₀ and TI of DGTs by *V.fischeri*.

Acknowledgements

Financial support was received from the Catalan Agency of Water (Spain). The authors thank Per-Anders Bergqvist for his assistance in deploying SPMDs.

References

- Alvarez-Guerra M, González-Piñuela C, Andrés A, Galán B, Viguri JR. Assessment of Self-Organizing Map artificial neural networks for the classification of sediment quality. *Environ Int* 2008;34:782-90.
- Augulyte L, Bergqvist PA. Estimation of water sampling rates and concentrations of PAHs in a municipal sewage treatment plant using SPMDs with Performance Reference Compounds. *Environ Sci Technol* 2007;41:5044-9.
- Ayyamperumal T, Jonathan MP, Srinivasalu S, Armstrong-Altrin JS, Ram-Mohan V. Assessment of acid leachable trace metals in sediment cores from River Uppanar, Cuddalore, Southeast coast of India. *Environ Pollut* 2006;143:34-45.

- Bombardier M, Bermingham N. The SED-TOX index: Toxicity-directed management tool to assess and rank sediments based on their hazard—concept and application. *Environ Toxicol Chem* 1999;18:685-98.
- Chapman PM. Determining when contamination is pollution -- Weight of evidence determinations for sediments and effluents. *Environ Int* 2007;33:492-501.
- Davison W, Zhang H. In situspeciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature* 1994;367:546-8.
- Docekalová H, Divis P. Application of diffusive gradient in thin films technique (DGT) to measurement of mercury in aquatic systems. *Talanta* 2005;65:1174-8.
- Giusti L, Barakat S. The monitoring of Cr(III) and Cr(VI) in natural water and synthetic solutions: An assessment of the performance of the DGT and DPC methods. *Water Air Soil Pollut* 2005;161:313-34.
- Huckins JN, Petty JD, Prest HF, Clark RC, Alvarez DA, Orazio CE, et al. A Guide For The use of Semipermeable Membrane Devices (SPMDs) as samplers of wasterborne hydrophobic organic contaminants. American Petroleum Institute, 2002.
- Johnson BT, Petty JD, Huckins JN, Lee K, Gauthier J. Hazard assessment of a simulated oil spill on intertidal areas of the St. Lawrence River with SPMD-TOX. *Environ Toxicol* 2004;19:329-35.
- Kočí V, Mlejnek M, Kochánková L. Toxicological evaluation of exposed SPMD membranes. *Cent Eur J Chem* 2003;1:28-34.
- Kočí V, Ocelka T, Mlejnek M, Grabic R. Efficiency assessment of wastewater treatment plant based on SPMD sampling. *Cent Eur J Chem* 2004;2:91-112.
- Kotas J, Stasicka Z. Chromium occurrence in the environment and methods of its speciation. *Environ Pollut* 2000;107:263-83.
- Luoma SN. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms-A review. *Sci Total Environ* 1983;28:1-22.
- Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL. Metal pollution of soils and vegetation in an area with petrochemical industry. *Sci Total Environ* 2004;321:59-69.
- Nadal M, Kumar V, Schuhmacher M, Domingo JL. Definition and GIS-based characterization of an integral risk index applied to a chemical/petrochemical area. *Chemosphere* 2006;64:1526-35.
- Namiesnik J, Szefer P. Analytical Measurements in Aquatic Environments. IWA Publishing, 2009.
- Nriagu JO, Nieboer E. Chromium in the natural and human environments. The Wiley Series in Advances in Environmental Science and Technology National Water Research Institute Burlington, Ontario, Canada, 1988.
- Ocampo-Duque W, Sierra J, Ferré-Huguet N, Schuhmacher M, Domingo JL. Estimating the environmental impact of micro-pollutants in the low Ebro River (Spain): An approach based on screening toxicity with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere* 2008;72:715-21.
- Pawlisz AV, Kent RA, Schneider UA, Jefferson C. Canadian water quality guidelines for chromium. *Environ Toxicol Water Qual* 1997;12:123-83.
- Rai D, Eary LE, Zachara JM. Environmental chemistry of chromium. *Sci Total Environ* 1989;86:15-23.

- Sherwood JE, Barnett D, Barnett NW, Dover K, Howitt J, Li H, et al. Deployment of DGT units in marine waters to assess the environmental risk from a deep sea tailings outfall. *Anal Chim Acta* 2009;652:215-23.
- Stumm W, Morgan JJ. *Aquatic Chemistry*. Wiley-Interscience, New York, 1981.
- Takeo N. Atlas of Eh-pH diagrams. Intercomparison of thermodynamic databases. Geological Survey of Japan Open File Report No 419. National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Research Center for Deep Geological Environments, Japan, 2005.
- Tan BLL, Hawker DW, Müller JF, Leusch FDL, Tremblay LA, Chapman HF. Comprehensive study of endocrine disrupting compounds using grab and passive sampling at selected wastewater treatment plants in South East Queensland, Australia. *Environ Int* 2007;33:654-69.
- US EPA. Freshwater Sediment Screening Benchmarks. US Environmental Protection Agency. . In: 2007.
- Van Beelen P. A review on the application of microbial toxicity tests for deriving sediment quality guidelines. *Chemosphere* 2003;53:795-808.
- Wang F, Leung AOW, Wu SC, Yang MS, Wong MH. Chemical and ecotoxicological analyses of sediments and elutriates of contaminated rivers due to e-waste recycling activities using a diverse battery of bioassays. *Environ Pollut* 2009;157:2082-90.
- Zhang H. Capabilities of DGT in Water. DGT- for measurements in waters, soils and sediments. DGT Research Ltd 2003;
- Zhang H, Davison W. Diffusional characteristics of hydrogels used in DGT and DET techniques. *Anal Chim Acta* 1999;398:329-40.

DISCUSSIÓ DEL CAPÍTOL II

En aquest capítol, s'ha estudiat la contaminació i l'ecotoxicitat de les aigües i els sediments d'onze rius catalans mostrejats mitjançant sistemes convencionals (presa de mostra puntual) i per mitjà de mostrejadors passius (DGTs i SPMDs) dissenyats per a captar la fracció de contaminants biodisponible. A partir de l'estudi realitzat, s'ha observat que quan s'efectuen mostrejos d'aigua mitjançant una presa de mostra puntual, és convenient separar-ne dues fraccions (aigua filtrada i no filtrada) ja que aporta informació útil sobre la contaminació present en solució i l'associada a partícules. A més, s'observà que mitjançant l'aplicació dels diagrames de Pourbaix (Eh-pH) (Takeno, 2005), aquells metalls que formen espècies químiques catióniques com Zn (Zn^{2+}), Mn (Mn^{2+}), Ni (Ni^{2+}) i Pb ($(OH)^+/Pb^{2+}$) tenen tendència a romandre en la fracció particulada de l'aigua, mentre que aquells que formen anions, tals com As ($HAsO_4^{2-}$) i V ($H_2VO_4^-/HVO_4^{2-}$), es troben més en solució. En el cas del crom, que pot presentar dos possibles estats d'oxidació, Cr (III) i Cr (VI), pot formar tant espècies catióniques (Cr^{3+} , $CrOH^{2+}$) com anióniques (CrO_4^{2-}) depenent de les característiques del medi (pH, Eh, presència de substàncies reductores, etc). S'ha observat que en els rius més antropitzats (Besòs i Canal de la Infanta), hi predomina la forma aniónica que és soluble (Cr VI), que alhora n'és la més tòxica.

Les mostres d'aigua puntual no han permès detectar toxicitat ni amb el test Microtox[®] amb *Vibrio fischeri* ni mitjançant el test d'algues amb *Pseudokirschneriella subcapitata*.

La utilització de sistemes **DGT** dissenyats com a dispositius d'especiació per mostrejar els metalls lliures (en forma iònica) i els complexos més làbils, permeten aproximar-se a la fracció de metalls biodisponible (Davison i Zhang, 1994). Amb aquests dispositiu, contràriament al mostreig convencional, es permet l'obtenció de concentracions mitjanes evitant les fluctuacions en el temps (per descàrregues puntuals per exemple). A més, han permès detectar Cd en la majoria de mostres (que a partir de les mostres d'aigua puntual no s'havia detectat) i s'ha pogut, mitjançant la posterior extracció, determinar la toxicitat de les aigües fluvials. Els DGTs sembla ser que actuen per intercanvi catiónic (resina Chelex[®]) i per tant retenen millor els metalls catiónics. L'afinitat dels diferents metalls amb aquesta resina comparat amb els valors en aigua filtrada, decreix de la següent manera: Pb>>>Cr>Cd>Ni~Zn>Mn>>>V~As. El Hg no es

reté. En els rius on el Cr soluble és elevat, l'adsorció al DGT és baixa, fet que indicaria que hi predomina el Cr⁶⁺. En d'altres rius, com el cas del Fluvià, s'han observat valors elevats de Cr retingut al DGT i en canvi molt baixa toxicitat. Aquest fet indica el Cr³⁺ és l'espècie predominant. Per tant, aquests dispositius poden ser d'ajuda per determinar l'especiació de metalls en aigua.

La utilització dels captadors passius **SPMDs** per a mostrejar compostos orgànics en aigua es basa en l'afinitat dels contaminants per la trioleïna, un lípid de reserva present en nombrosos organismes aquàtics. Les molècules que fàcilment es retenen són compostos amb log Kow superior a 3 i diàmetre molecular inferior a 10Å, fet que equival aproximadament a uns 600 Dalton. En els rius estudiats s'han pogut detectar alguns hidrocarburs aromàtics policíclics, hexaclorociclohexans, clorbenzens i nonilfenols. Aquests resultats (no publicats) estan recollits a l'Annex I. En general, però, els resultats globals de l'estudi han mostrat concentracions bastant inferiors a les recomanades per la legislació (CEE, 2008) i les detectades en d'altres treballs (Shaw et al., 2004; Wang et al., 2009). Els sistemes SPMD tenen l'avantatge de poder obtenir concentracions mitjanes de contaminants orgànics, evitant possibles fluctuacions i arribar a límits de detecció força inferiors que en els mostresjos d'aigua puntual.

Pel que fa a l'**ecotoxicitat**, tant els DGT com els SPMD han permès avaluar la toxicitat de les aigües derivada de la presència de metalls i compostos orgànics lipòfils, respectivament. A partir dels resultats dels DGT, les aigües que manifesten major tòxicitat han estat les de l'Ebre i el Canal de la Infanta, mentre que els SPMD han presentat més toxicitat al Besòs, el Ter, el Canal de la Infanta i el Llobregat.

Quant a la toxicitat dels **sediments**, es pot afirmar que els extractes aquosos (fracció més biodisponible) han presentat menor toxicitat que els extractes orgànics. Aquest fet rau en que la fracció més hidrosoluble dels contaminants és alliberada constantment del sediment degut al pas de l'aigua, de manera que la fracció que queda retinguda al sediment, és la fracció més lipòfila o en cas dels metalls, són aquells que queden més adsorbits a la pròpia matriu del sediment. A partir de la combinació de l'anàlisi química de metalls totals presents en el sediment i l'aplicació de tests d'ecotoxicitat amb la fracció aquosa del sediment, s'ha observat que no sempre existeix una correlació directa. Les concentracions totals de metalls dels sediments han superat en molts

casos els límits marcats per la legislació nordamericana (US EPA 2006), però a l'hora d'avaluar-ne l'ecotoxicitat, aquesta ha estat baixa, probablement pel fet que la fracció de metalls que queda al sediment és molt poc biodisponible. És important incloure el sediment sempre que s'estudiïn els sistemes fluvials, ja que aquesta matriu pot ser una font de contaminants per a la columna d'aigua, i lògicament per als organismes bentònics.

En relació als dos bioassajos realitzats, *Pseudokirschneriella subcapitata* ha resultat ser més sensible en extractes aquosos de sediments, mentre que *Vibrio fischeri* ha resultat ser més sensible en extractes orgànics tant de sediments com de SPMD. En tot cas, sembla ser que són dos tests que es podrien complementar fàcilment. La toxicitat trobada en DGT ha presentat bona correlació amb la toxicitat general del sediment. En canvi, la toxicitat dels SPMD ha correlacionat sobretot amb la toxicitat del sediment derivada de compostos orgànics lipòfils (extractes orgànics), fet lògic tenint en compte el mecanisme d'acció d'aquestes membranes. A l'Annex I es pot observar la bona correlació entre els índex de toxicitat (per *Vibrio fischeri*) i les concentracions trobades de fluorè, α -HCH, pentaclorbenzè i de nonilfenols i nonilfenols etoxilats.

El fet que en general tant la càrrega de contaminant com la toxicitat hagi resultat major en el sediment envers l'aigua i els contaminants adsorbits als mostrejadors passius, indica que el sediment és el principal embornal de contaminants en els ecosistemes fluvials. Els organismes que hi viuen acumulen una fracció de la contaminació que està a mig camí entre la concentració present a les aigües i els sediments. Aquesta fracció és molt complicada de predir, de manera que amb l'ajuda dels DGT i SPMD es pot arribar a aproximar a aquesta fracció i determinar-ne la toxicitat, malgrat encara potser s'estigui lluny del que passa en realitat.

En estudis pendents de publicar, s'ha observat que els resultats d'ecotoxicitat obtinguts amb *Vibrio fischeri* en sediments i extractes de mostrejadors passius, segueixen una tendència similar a alguns índex de valoració d'estat ecològic dels rius a partir de macroinvertebrats d'aigua dolça (IBMWP, Iberian Biomonitoring Working Party), número de famílies de macroinvertebrats i l'índex de diversitat de Shannon (H'). No obstant, faran falta més estudis per acabar de demostrar la complementarietat d'aquestes tècniques

CAPÍTOL III

RESIDUS ORGÀNICS: FANGS DE DEPURADORA

Resum de l'Article

Relació entre el nivell de contaminants i l'ecotoxicitat de fangs de depuradora procedents de plantes de tractament d'aigües residuals espanyoles.

En aquest capítol es presenta un treball en el qual s'analitzaren 28 mostres de fangs de depuradora procedents d'estacions depuradores d'aigües residuals espanyoles, per tal de valorar la seva idoneïtat com a esmena orgànica en agricultura. Les mostres de fangs de depuradora es classificaren en quatre categories d'acord amb el tractament específic rebut a la planta depuradora: digestió aeròbica o anaeròbica i assecat mecànic o tèrmic. També s'inclogueren a l'estudi mostres de fang compostat, com a exemple de la fase més processada dels fang. Les mostres de fangs i composts es sotmeteren a una caracterització fisicoquímica a més d'estudiar-ne el grau d'estabilitat de la matèria orgànica mitjançant tècniques de respirometria. S'analitzà també la concentració de set metalls (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn, Ni i Hg) i de compostos orgànics (compostos fenòlics, hidrocarburs aromàtics policíclics, bifenils policlorats, naftalens policlorats, difenil-èters polibromats i compostos perfluorats). Finalment s'avaluà la fitotoxicitat de les mostres mitjançant el test de germinació i elongació de l'arrel amb llavors de *Allium cepa* (alls), *Lolium perenne* (raigràs perenne) i *Raphanus sativus* (rave) i es realitzà el test Microtox[®] amb *Vibrio fischeri*. Els resultats de l'estudi mostraren diferències significatives en els següents paràmetres depenent del tractament rebut del fang: matèria seca, conductivitat elèctrica, nitrogen, matèria orgànica i la seva estabilitat, fitotoxicitat i ecotoxicitat. Al mateix temps, no es trobaren diferències significatives entre categories, en la concentració de la majoria de metalls i compostos orgànics, amb l'excepció dels compostos fenòlics. Igualment no es trobà cap correlació entre la càrrega total de metalls i els resultats obtinguts d'ecotoxicitat. No obstant, es trobà una bona correlació entre la concentració de compostos fenòlics i la majoria de tests d'ecotoxicitat. El compostatge del fang es va identificar com el tractament que detoxifica més. Els resultats d'aquest estudi, porten a suggerir que l'estabilitat dels fangs de depuradora (condicionada pel tipus de tractament del fang) i la presència d'alguns compostos orgànics no analitzats en els mètodes rutinaris com són els compostos fenòlics, poden tenir més influència en l'ecotoxicitat dels fangs que la pròpia càrrega de contaminants.

Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants

Neus Roig, Jordi Sierra, Martí Nadal, Esther Martí, Pedro Navalón-Madrigal, Marta Schuhmacher, José L. Domingo

Publicat a Science of the Total Environment (2012) 425: 99-109

ABSTRACT

Chemical and ecotoxicological properties of 28 sewage sludge samples from Spanish wastewater treatment plants were studied in order to assess their suitability for agricultural purposes. Sludge samples were classified into five categories according to specific treatment processes in terms of digestion (aerobic/anaerobic) and drying (mechanical/thermal). Composted samples, as indicative of the most refined process, were also considered. Sludges were subjected to physical-chemical characterization, being the sludge stabilization degree respirometrically assessed. The concentrations of seven metals (Cd, Cr, Cu, Pb, Zn, Ni, Hg) and organic substances (phenolic compounds, polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls, polychlorinated naphthalenes, polybrominated diphenyl ethers, and perfluorinated compounds) were determined. Finally, two ecotoxicological tests were performed: i) Microtox[®] toxicity test with *Vibrio fischeri*, and ii) root elongation test with *Allium cepa*, *Lolium perenne* and *Raphanus sativus* seeds. Significant differences were found in the following parameters: dry matter, electrical conductivity, nitrogen, organic matter and its stability, phytotoxicity and ecotoxicity, depending on the sludge treatment. In turn, no significant differences were found between categories in the concentrations of most metals and organic pollutants, with the exception of free phenolic compounds. Furthermore, no correlation between total heavy metal burden and ecotoxicity was observed. However, a good correlation was found between phenolic compounds and most ecotoxicological tests. These results suggest that sludge stability (conditioned by sludge treatment) might have a greater influence on sludge ecotoxicity than the pollutant load. Composting was identified as the treatment resulting in the lowest toxicity.

1. Introduction

After the implementation of the Council Directive on Urban Wastewater Treatment (EC, 1991), sewage sludge production has significantly increased in the European Union (EU). Briefly, sewage sludge is generally produced as a result of the sedimentation processes throughout primary and secondary waste water treatment processes. These biosolids, with more than 95% of moisture, can be subjected to different processes in order to reduce its mass and volume, stabilize the organic fraction, sanitize, or adequate it to its final destination. The most simple and frequent treatments are those applied to dewater biosolids by mechanical processes, obtaining biosolids with 18%-35% of dry matter content. The main biological stabilization processes are aerobic or anaerobic digestions, depending on the presence or absence of O₂, respectively. In Spain, it seems that the treatment systems more often used are: anaerobic digestion with or without energy recovery (biogas), representing up to 68%, aerobic digestion (14%), chemical stabilization (8%), and non-stabilization (8%) (MAGRAMA, 2009). Nowadays, there is an increasing tendency to introduce additional post-treatments such as thermal-drying or composting (14 and 10% of cases, respectively) for the improvement of sludge properties. In this context, the chemical properties of sewage sludge may change depending on sludge source and the treatment efficiency (Wong et al., 2001).

The total amount of sewage sludge produced in the EU is expected to be 13 million tons in 2020, being 44% of this recycled to land (EC, 2008). These materials may be used as alternative fuels in cement plants, becoming an interesting practice of high interest worldwide (Rovira et al., 2010). The use of this sludge on agriculture, around 40% of the total generated according to (Milieu Ltd, 2008), is known to be one of the best recycling routes, in contrast to landfilling or incineration/co-combustion. According to Spanish regulations (BOE, 1990), only the sludge which has undergone biological, chemical or heat treatment, long-term storage or any other appropriate process so as to significantly reduce its fermentability and the health hazards resulting from its use, can be applied to agriculture. Considering that sludge produced in wastewater treatment plants may contain nutrients and energy that can be beneficially recovered, many efforts have been recently made to develop new technologies to handle sludge and make useful products out of them (Tas, 2010). Before its application as agricultural fertilizer, current legislations usually consider the content of heavy metals

in sludge, as well as that in soil (EC, 1986). However, although there is a working document on sludge published more than a decade ago (EU, 2000), there are no legislative measures to limit other potential hazards such as organic pollutants concentration or its ecotoxicity. Despite the lack of a harmonized European policy regarding this subject, some countries (e.g., Denmark, Sweden, Austria or Germany) have set standards limiting the concentration of certain organic contaminants in sewage sludge (EC, 2001a) that can be used in agricultural soils.

It is largely known that sludge amendments in a correct rate improve soil physicochemical properties, including organic matter, nutrient contents, soil porosity, bulk density, aggregate stability and water holding capacity, or can increase the soil microbial biomass and its nutrient mineralization potential (Banerjee et al., 1997; Singh and Agrawal, 2008; Clarke and Smith., 2011). Meanwhile, the accumulation of undesirable substances contained in the sludge is an important factor to consider within sludge managements, as these substances may reach the food chain. Heavy metals, pathogens, and organic pollutants can also have a notable affection on soil functioning and biodiversity (Harrison et al., 2006; Ros et al., 2006; Tas, 2010).

The purpose of this study was to evaluate if some different treatment techniques could have influence on the suitability of sludge end products as soil improvers. In order to assess the potential environmental risks derived from the disposal or land application of sewage sludges, ecotoxicity tests combined with chemical analyses were carried out. Specifically, the influence of various sewage sludge treatments applied to a set of samples from different Spanish WWTPs was assessed by determining their physical-chemical properties, metal content, organic pollutants burden, and ecotoxicological characteristics.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Twenty eight samples of sewage sludge were obtained from the output of 24 urban WWTPs from Catalonia, Comunitat Valenciana and Castilla la Mancha, mainly situated in the Spanish Mediterranean coast (Figure 1); serving medium and large-sized towns with some limited industrial pollution inputs. All these sludge can be considered mixed sludge, since they are composed of primary and secondary sludge. Diverse samples,



Figure 1. Sewage sludge sampling points distributed between Autonomic Communities of Catalunya (SS5, 6, 9, 11-14, 18, 21, 22, 24-28), Comunitat Valenciana (SS1, 3, 7, 10, 15-17, 19, 23) and Castilla la Mancha (SS2, 4, 8, 20).

corresponding to different plant processes, were taken. Approximately 2 kg of composite samples of each biosolid were collected and deposited in three amber glass containers well washed with (a) nitric acid 10%, (b) deionized water, and (c) dichloromethane, and stored at 4°C for the transport to laboratory. Samples (a and b) were oven dried at 45 °C to constant weight, grounded and sieved (< 150µm) in order to perform the metal, physico-chemical and ecotoxicological analyses. Sample (c) was freshly stored at 4°C and rapidly analyzed in order to perform organic compounds extraction and respirometric analysis.

2.2 Samples classification

Sludge samples were classified into main 5 different types according to the sludge treatment and post-treatment processes (Table 1): i) 5 samples of non-digested sludges (NDMD); ii) 6 sludges aerobically digested and mechanically dried (AeDMD); iii) 6 sludges anaerobically digested and mechanically dried (AnDMD); iv) 6 sludges anaerobically digested and thermally-dried at temperatures around 80-130°C (AnDTD); and v) 5 samples of anaerobically digested and composted sludge mixing sludges and pruning wastes (AnDC). Dewatering by mechanical drying includes centrifuging, filter belt and filter press processes.

Table 1
 Sewage sludge classification according to waste water treatment processes.

Code	Treatment	Post-treatment
NDMD	None	None
AeDMD	Aerobic digestion, mechanical dewatering	None
AnDMD	Anaerobic digestion, mechanical dewatering	None
AnDTD	Anaerobic digestion, mechanical dewatering	Thermal drying
AnDC	Anaerobic digestion, mechanical dewatering	Composting

2.3. Physical-chemical characterization

The moisture content of sludges was estimated by calculating the weight loss after drying in an oven at 105°C. Thereafter, the samples were burnt at 550 ± 25°C and the organic matter estimated by duplicate as the weight loss as loss-on-ignition (EN-12879, 2000). The electrical conductivity and pH were determined by duplicate in water eluates ratio 1:2.5 (w/v). Total nitrogen and oxidizable carbon were quantified by means of the Kjeldalh (EN13342, 2000) and Walkley Black methods by duplicate, respectively. C/N ratio was calculated using oxidizable carbon and total nitrogen values. Since there is no universally accepted index to assess biosolids stability (Komilis et al., 2011) a static respiration test was performed by triplicate on fresh samples (10 g dry matter) to estimate the sludge organic matter stability. This was done by incubating sludge at 35°C and at 50% of water holding capacity for 4 days. Oxygen consumption was analyzed every hour by manometric respirometry (Oxitop[®], WTW). The cumulative consumption of oxygen was monitored during the incubations. The results are expressed as referred

to the weight of sludge (mg O₂/g sludge dry basis) and to the losses on ignition per hour (mg O₂/LOI h).

2.4. Chemical analysis

Approximately 150 mg of each dried sample were treated with 2 mL of nitric acid (65% Suprapur, E. Merck, Darmstadt, Germany) for 8 h at room temperature. Subsequently, they were heated at 80°C for 8 h. Once filtered, solutions were diluted to 10 mL. The concentrations of Cd, Cr, Cu, Pb, Zn, Ni, Hg, Ca, Mg, K and P were determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS, Perkin Elmer Elan 6000) by duplicate (Nadal et al., 2007). Blanks, controls and standard materials (Loamy clay soil, Resource Technology Corporation US, CRM 052) were used for quality control/quality assurance. The recovery percentages of the reference material ranged 82-119%.

For the priority organic compounds extraction, 1 g ± 0.01 g of fresh sewage sludge was mixed with anhydrous sulfate and 15 mL of acetone:hexane (1:1), sonicated at 50°C for 30 min and filtered according to US EPA method 3550B (US EPA, 1996), then solvent was evaporated to a final volume of 500 µL. Then, a clean up stage using an aliquot of 400 µL was performed by means of solid-phase extraction with Fluorisil[®] cartridges, eluted with 10 mL of hexane. This extract was analyzed by gas chromatography. The other aliquot (100 µL) was ready to be analyzed by HPLC-MS (high pressure liquid chromatography coupled to mass spectrometry).

The concentration of the 16 US EPA priority polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), 21 congeners of polychlorinated biphenyls (PCBs), including the 7 environmental markers (PCB# 28, 52, 101, 118, 138, 153 and 180), 4 polychlorinated naphthalenes (PCNs), 11 polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and 12 nonylphenols (NPEs) were quantified by duplicate with a Varian GC 3800 – MS 320 gas chromatograph coupled to a mass spectrometer and a ZB5MS (Zebron, USA) capillary column (30m x 0.25 mm x 0.25 µm). Pure helium was used as the carrier gas at flow rate of 52 cm seg⁻¹. Injection mode was splitless and the injection port temperature was maintained at 250°C. The oven temperature was programmed as follows: 1 min at 60°C and a rate of temperature increase of 25°C min⁻¹ until 150°C and then 10°C min⁻¹ up to the temperature program of 320°C during 10 minutes. For the analysis of deca-BDE some modifications of the latter method were done. The capillary column used was a

DB-5MS (J&W Scientific, Folsom, USA), 15 m x 0.25 mm x 0.25 μm and the following temperature program was used: initial temperature of 80°C, followed by a temperature ramp of 12°C min^{-1} up to 250°C, and then 25°C min^{-1} up to 300°C and maintained during 10 minutes. For MS detector, the scan operating parameters were: electron impact at 70 eV and a scan mass range of 100-1000 u. The perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanesulfonic acid (PFOA) were analyzed by duplicate by HPLC-MS/MS, using an Agilent 1200 Binary SL Rapid Resolution Series Pump chromatograph. An Eclipse XDB-C18 Agilent column (4.6 ID x 50 mm, 1.8 μm) with a binary mobile phase, A (water) and B (methanol) following a linear gradient and flow rate of 0.8 ml min^{-1} . The initial conditions were 100% of phase A, and the gradient was carried out with an increase of phase B of 5% per minute. Detection was performed with a mass selective spectrometer, Agilent 6410, equipped with a turbo ion spray ionizing in negative mode. The detection limits were 0.01 mg/kg for PAHs, PCBs, PCNs and PBDEs; 0.1 mg/kg for NPEs, and 5 $\mu\text{g/kg}$ for PFOS and PFOA. Phenolic compounds were extracted by shaking for 12 h 1 g fresh sample with 10 mL deionized water, then filtered (Whatmant[®] -42) and analyzed by the Folin Ciocalteu Method (Box, 1983).

2.5. Ecotoxicity assays

To distinguish the toxicity derived from polar and non-polar compounds, two types of extractions (aqueous and organic) were performed in duplicates for all sludge samples. Aqueous extracts were done according to 1:10 (w/v) DIN 38414 S4, while organic extractions were performed according to US EPA method 3546 (USEPA, 2000). Briefly, 2 g of dried sewage sludge was mixed with 30 mL of acetone:hexane (1:1) and microwave extracted for 20' at 115°C. The pressure reached was approximately of 135 PSI. After the extraction, the organic solvent was evaporated at 45°C under negative pressure, being the resulting fraction mixed with 4 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO). Ecotoxicity of aqueous and organic extracts were analyzed in triplicates on the bioluminescent bacteria *Vibrio fischeri* by Microtox[®] Acute Basic Test. Seed Germination/Root Elongation Toxicity Test was performed in the 1:10 water extracts according to the US EPA Ecological Effects Test Guidelines (USEPA, 1996). Ten seeds of the monocotyledons *Allium cepa* and *Lolium perenne*, and the dicotyledon *Raphanus sativus* were grown in tetraplicate on filter papers in Petri dishes for each extract (5 mL). Four control dishes were performed with deionized water for each

species. Incubation period was seven days for *R. sativa* and *L. perenne* seeds and 10 days for *A. cepa* seeds. The Germination Index (GI) was calculated by comparing the number of germinated seeds and root lengths of the samples with respect to the control seeds (Zucconi et al., 1985).

2.6. Statistics

Statistical treatment of the data was performed by means of the SPSS 17.0 software package. The Levene test was used where data followed a normal distribution. Subsequently, the analysis-of-variance (ANOVA) and Duncan Tests were used to assess significant differences between parametric parameters, while the Mann-Whitney U-Test was executed to evaluate significant differences between non-parametric parameters. Additionally, Spearman correlation was also executed because it is a generic correlation test that can be applied for both linear and non-linear associations. Probabilities lower than 0.05 ($p < 0.05$) were considered as statistically significant.

3. Results and discussion

Mean values of the physical-chemical parameters, nutrient content and the results of the respirometries corresponding to each type of sludge are summarized in Table 2. The percentage of moisture showed a very wide range, from 4.2% to 94.9% (compost samples and AeDMD samples, respectively), decreasing significantly with the complexity of the sludge treatment techniques. The values of pH remained near the neutrality for all types of sludge, except non-digested sludge that presented a slight acidity, which could be due to the presence of acidic flocculants as ferric salts.

Table 2

Sludge characterization including physical-chemical parameters, nutrient content and respirometric results.

SLUDGE TREATMENT	Dry matter (%)	pH	EC (dS/m)	Oxidizable C (%)	Organic matter as LOI (dw) (%)	Total N (%)	C/N	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Cumulative O ₂ consumption	
												mg O ₂ * dry g ⁻¹	mg O ₂ * g ⁻¹ LOI h ⁻¹
NDMD	20.1 ± 10.2 ^a	6.4 ± 1.1	9.1 ± 1.7 ^{bc}	20.3 ± 3.4	48.3 ± 8.1 ^b	6.6 ± 1.4 ^a	2.5 ± 0.9	5.8 ± 1.7	0.3 ± 0.1	3.9 ± 1.1	0.8 ± 0.3	203 ± 25.5 ^a	4.5 ± 0.8 ^c
max	28.1	7.6	11.4	23.7	55.9	6.7	3.7	5.9	0.3	4.5	1.2	229	5.6
min	5.1	5.4	7.6	16.1	38.0	5.5	2.1	4.8	0.2	3.1	0.2	168	3.8
AeDMD	18.9 ± 7.4 ^a	7.3 ± 0.6	6.3 ± 2.0 ^{ab}	19.7 ± 0.2	45.0 ± 1.1 ^b	6.4 ± 0.2 ^a	4.2 ± 0.1	4.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1	5.5 ± 1.1	0.9 ± 0.1	144 ± 24.9 ^{ab}	3.3 ± 0.6 ^c
max	24.5	7.6	8.6	20.1	43.9	6.6	4.3	4.7	0.7	6.3	0.9	178	4.2
min	8.5	6.4	4.1	19.4	46.0	6.2	4.2	4.5	0.6	4.7	0.8	120	2.8
AnDMD	24.6 ± 5.5 ^a	7.3 ± 0.4	5.0 ± 1.5 ^a	19.5 ± 2.9	42.9 ± 6.2 ^{ab}	3.9 ± 1.1 ^b	9.1 ± 3.8	3.8 ± 0.9	0.3 ± 0.2	6.9 ± 2.8	0.7 ± 0.2	114 ± 56.9 ^b	2.8 ± 1.2 ^{bc}
max	35.5	7.9	7.1	24.0	35.3	5.3	16.0	4.6	0.7	12.7	1.1	226	5.4
min	15.8	6.7	2.7	15.2	51.9	1.4	5.3	2.2	0.1	3.2	0.4	12.3	2.5
AnDTD	72.0 ± 28.6 ^b	7.2 ± 0.6	6.3 ± 2.2 ^{abc}	18.2 ± 4.7	37.7 ± 9.1 ^{ab}	3.4 ± 1.7 ^b	6.3 ± 1.9	2.2 ± 0.2	0.2 ± 0.1	5.8 ± 1.6	0.6 ± 0.1	38.7 ± 27.0 ^c	1.2 ± 0.9 ^{ab}
max	95.8	7.8	9.2	24.5	29.2	4.1	7.8	2.8	0.3	6.7	0.8	63.9	2.3
min	30.5	6.7	3.9	13.9	49.7	3.2	5.9	2.1	0.1	5.1	0.4	0.4	0.2
AnDC	82.2 ± 2.6 ^c	7.3 ± 0.2	9.3 ± 3.3 ^c	18.3 ± 4.8	33.4 ± 7.5 ^a	3.5 ± 0.1 ^b	7.2 ± 1.1	4.1 ± 1.1	0.6 ± 0.2	9.5 ± 3.4	1.4 ± 0.9	30.1 ± 17.0 ^c	0.9 ± 0.3 ^a
max	84.0	7.5	11.6	21.7	28.1	3.6	7.9	6.4	0.8	11.5	1.6	42.1	1.5
min	80.3	7.2	7.0	14.9	39.7	3.4	6.8	1.2	0.6	8.4	1.1	18.0	0.5

Results are given as mean ± standard deviation; maximum and minimum values (dry matter).

Different superscripts in the same column indicate significant differences at ($p < 0.05$), while the same superscripts (or absence) show that differences are not significant ($p > 0.05$).

NDMD: Non digested mechanically dried sludge; AeDMD: Aerobic digested and mechanically dried sludge; AnDMD: Anaerobic digested and mechanically dried sludge.

AnDTD: Anaerobic digested and thermally dried sludge; AnDC. Anaerobically digested and composted; EC: electric conductivity. OC: oxidizable carbon.

Electrical conductivity values were high (from 5 to 9 dS/m) and similar for different types of treatment, something of importance in case these waste were intended for application to soils with saline tendency. Carbon values remained constant between treatments, while N decreased significantly in sludges treated by anaerobic digestion (AnDMD, AnDTD and AnDC). This could be partly explained by the denitrification process and the loss of ammonia, which occurs under anaerobic conditions, as well as the consequent loss of nitrous oxides or molecular nitrogen during biogas production (Flotats Ripoll et al., 2004). For this reason, C/N ratio tends to increase in anaerobically treated sludges. Regarding macronutrients, Ca was the most abundant, with percentages ranging from 3.9% to 9.5%. No significant differences between sludge treatments were noted. NDMD treatment presented the highest concentrations of N and P, while compost showed the greatest levels of Ca and Mg. Finally, the values of K were similar independently on the treatment process. This macronutritional content distribution depends not only on the treatment efficiency, but also on the sources of sewage of each plant (Wong et al., 2001).

In order to obtain indirect indicators of the degree of organic matter stability, respirometric assays were here performed in all sludge samples. Respirometric techniques can be used to determine biological and organic matter stability of biodegradable materials (Barrena et al., 2009; Gea et al., 2004; Komilis and Tziouvaras, 2009). Both parameters obtained from the respirometric test showed significant differences depending on the sludge treatment. In general, stability (lower oxygen consumption) of the selected sewage sludge increased in the following order: NDMD < AeDMD < AnDMD < AnDTD < AnDC, being the composted sludge the most stabilized materials. Many authors have proposed values of oxygen uptake to describe the stability degree of composted materials (California Compost Quality Council, 2001; EC, 2001; Körner et al., 2003; Barrena et al., 2009). According to the literature it can be said that in the case of composts, oxygen uptake values lower than 30 mg O₂ g dry sludge⁻¹ in 4 days can be considered as stable organic matter, while those uptaking >80 mg O₂ g dry sludge⁻¹ are considered as raw organic matter. Considering the oxygen uptake to loss of ignition ratios, values below 1-1.3 mg O₂ LOI⁻¹h⁻¹ are considered mature materials. Comparing these values with our results, compost and anaerobic digested plus thermal dried samples presented values closer to fall into the stable organic matter category. For composted samples, this is probably due to the fact that microbial degradation of the most labile organic fractions is higher during composting

process than during the other treatments (Andrés et al., 2011; Sánchez-Monedero et al., 1999). Surprisingly, thermally dried samples showed stability values similar to the composted ones, regarding this respirometric approximation. However, these samples show higher phytotoxicity than the composted ones (Fig. 2). Both properties are some of the usually used parameters to establish the stability and maturity of organic wastes (Komilis et al., 2011). It must be highlighted that, particularly in sludges with low C/N values (<8), high respiration activity may involve significant risks of soil and water pollution, due to the release of elements contained in sludge (N, pollutants, etc.). Regarding thermal treatment processes, the application of temperature has proven to modify the potential of Nitrogen mineralization and the N forms in the sludge materials (Matsuoka et al., 2006). Also, high temperature levels may cause a reorganization of the organic matter as volatilization of some compounds, chemical reactions, protein denaturation and, depending on the temperatures reached, higienization processes, all of them affecting the sludge maturity degree.

The mean concentrations, as well as maximum and minimum values of heavy metals in the five different categories of analyzed sewage sludges are summarized in Table 3. Metal concentration of each sample was compared with the limit values set by Spanish current legislation (derived from the European directive 86/278/EEC), those proposed in 3rd Draft of Working Document on Sludge and those expected for medium and long-term (year 2015 and 2025 respectively), also included in the 3rd Draft. According to these directives, 85.7% of the total samples fulfill the current legislation and 3rd Draft, 71.4% of samples would fulfill the purposed limits for 2015, and only 42.8% would fulfill the purposed legislation for 2025. Taking into account this analysis, as sewage sludge legislation becomes more stringent, the concentration of heavy metals could be soon a problem for the application of these biosolids in soil. Among the analyzed elements, the most problematic metals are Hg, Cd, Cu, Zn and Ni. Only Pb presented significant differences ($p < 0.05$) between sludge categories, possibly due to the different water inputs in each WWTP. All other metal concentration within sludge samples from the same category, presents a lot of variability, probably because heavy metal composition of sludges can be extremely variable due to different kinds of effluents discharged into sewers (García-Delgado et al., 2007; Sommers, 1977). Anyhow, the results of this work are in accordance with the ranges reported by other authors (Bright and Healey, 2003; Dai et al., 2007; Scancar et al., 2000; Smith, 2009) and are representative of the urban WWTP of the Spanish Mediterranean coast, that in

more or less extent receive not only domestic wastewaters but some industrial discharges also.

Table 3
 Concentrations of heavy metals (in mg dry kg⁻¹) in sewage sludge samples according to the different treatments.

Sludge Treatment	Cd	Cr	Cu	Pb	Zn	Ni	Hg
NDMD	5.3 ± 6.6	61.1 ± 18.8	209.8 ± 52.1	95.8 ± 11.9 ^a	939 ± 422	41.1 ± 36.3	9.9 ± 12.6
max	13.0	85.0	272.2	109.3	1385.0	95.5	18.8
min	1.1	39.0	146.0	87.0	458.0	21.7	1.1
AeDMD	1.7 ± 0.4	182 ± 226	173 ± 30.4	46.6 ± 21.0 ^b	578 ± 138	43.4 ± 17.2	9.6 ± 12.2
max	1.9	518	204.0	70.4	783.4	63.0	23.4
min	1.1	38.0	131.2	28.3	487.0	24.8	0.2
AnDMD	3.1 ± 2.4	149.2 ± 75.6	577 ± 344	68.0 ± 26.0 ^{ab}	1015 ± 440	103 ± 108	1.5 ± 0.9
max	8.2	285	1456.0	123.0	1550.0	410	3.1
min	1.0	50.6	243.0	27.0	2.5	28.0	0.5
AnDTD	3.6 ± 2.4	200 ± 148	447 ± 256	75.0 ± 16.0 ^{ab}	1508 ± 748.5	79.0 ± 69.6	8.9 ± 11.2
max	7.0	339	744.0	96.0	2292	183	21.8
min	1.5	57.8	229.0	57.5	801.0	37.0	2.2
AnDC	2.9 ± 2.1	64.5 ± 24.7	354 ± 119	76.5 ± 17.7 ^{ab}	874 ± 274	24.0 ± 11.3	1.6 ± 0.7
max	4.3	82.0	438.0	89.0	1068	32.0	2.0
min	1.4	47.0	270.0	64.0	680	16.0	1.1
Limit values							
R.D. 1310/1990	20-40	1000-1500	1000-1750	750-1200	2500-4000	300-400	16-25
3 rd Draft ⁽¹⁾	10	1000	1000	750	2500	300	10
2015 ⁽²⁾	5	800	800	500	2000	200	5
2025 ⁽³⁾	2	600	600	200	1500	100	2

Results are given as mean ± standard deviation. Max: maximum; Min: minimum. Different superscripts in the same column indicate significant differences at ($p < 0.05$), while the same superscripts (or absence) show that differences are not significant ($p > 0.05$). NDMD: Non digested mechanically dried sludge; AeDMD: Aerobic digested and mechanically dried sludge; AnDMD: Anaerobic digested and mechanically dried sludge. AnDTD: Anaerobic digested and thermally dried sludge; AnDC: Anaerobically digested and composted

Limit values of R.D. 1310/1990 ranged between soils with pH lower or higher than 7 respectively. (1) limit values proposed in 3rd Draft of Working Document on Sludge (Annex III). (2) and (3) Limit values proposed at medium term (about 2015) and long term (about 2025) in 3rd Draft of Working Document on Sludge

Table 4 shows the concentrations of various organic compounds in sewage sludge according to the treatment. Free soluble phenolic compounds presented the highest levels, ranging from 463 to 2431 mg/kg in composted and non-digested sludge, respectively. The reduction of phenolic compounds in composting processes was previously observed by Pascual et al. (1997) and Hachicha et al. (2009). In the present study, the concentrations of these chemicals were found to be significantly lower in the compost than in the remaining non-composted sludges ($p < 0.05$). On the other hand, persistent organic pollutants (POPs) showed notably lower concentrations, being in most cases below their respective limits of detection. Moreover, no significant differences were appreciated for any of the remaining organic compounds according to

the type of treatment received. The PAH profile was similar in all groups, as phenanthrene was the predominant hydrocarbon independently on the treatment. The contributions of this compound were 36%, 47%, 34%, 29% and 50%, with respect to total PAHs in NDMD, AeDMD, AnDMD, AnDTD and AnDC samples, respectively. There were no significant differences between total mean concentrations of $\Sigma 16$ -PAHs which ranged from 0.97 to 2.96 mg/kg, being the lowest concentration in thermally dried samples. This could be explained because PAHs tend to reduce their concentration in samples treated by thermal drying, as high temperatures (100-150°C) enhance the volatilization of hydrocarbons, in general, and low-molecular weight PAHs, in particular (Oleszczuk, 2008b, 2009). Compost samples also presented lower PAHs values. It could be due to the combination of microbial biodegradation and volatilization which occurs at high temperatures during the thermophilic stage of composting procedure (Hua et al., 2008). Anyway, mean levels of total PAHs fulfilled the threshold levels established in the 3rd EU Working Document on Sludge (6 mg/kg). However, two single samples, corresponding to AeDMD and AnDMD treatments, slightly exceeded the proposed value (6.18 and 6.11 mg/kg, respectively). Mean concentrations of PCBs ranged between 0.23 and 0.76 mg/kg, being therefore below the provisional threshold: 0.8 mg/kg. Nevertheless, when considering samples individually, it could be stated that 11 of the 28 samples exceeded the guideline value. It indicates that, despite the mean levels would not be of concern; special attention should be paid on sludge samples with respect to the PCB contents, independently on the kind of treatment. PCB138, PCB153 and PCB180 were the only PCB congeners detected in all sludge treatments. The low PCB values could be explained taking into account that many congeners are semi-volatile, and during thermal treatments volatilization becomes the most likely route of PCB loss (Gibson et al., 2007). PCB35 was the most dominant congener in NDMD, AeDMD and AnDMD samples, while PCB101 and PCB20 presented the highest concentrations in AnDTD and AnDC samples, respectively. Again, some sludge samples exceeded the value of 50 mg/kg currently proposed for NPEs. In fact, mean concentrations of AeDMD and AnDMD samples were clearly above the maximum

Table 4
 Concentrations of organic compounds in sewage sludge samples according to the different treatments.

	NDMD			AeDMD			AnDMD			AnDTD			AnDC		
	MEAN ± SD	MAX	MIN	MEAN ± SD	MAX	MIN	MEAN ± SD	MAX	MIN	MEAN ± SD	MAX	MIN	MEAN ± SD	MAX	MIN
<i>Phenolic compounds (mg kg⁻¹)</i>	2431	3548	1701	1950^a ± 872	2976	843	1726^a ± 523	2829	1036	1613^a ± 666	2506	926	463^b ± 360	718	208
<i>TOTAL PAHs (mg kg⁻¹)</i>	1.36 ± 0.91	2.96	0.69	2.96 ± 2.58	6.18	0.69	2.42 ± 1.50	6.11	0.66	0.97 ± 0.28	1.35	0.59	0.99 ± 0.02	1.00	0.97
Naphthalene	0.24 ± 0.07	0.55	0.13	0.17 ± 0.21	0.44	0.01	0.34 ± 0.26	0.99	0.01	0.15 ± 0.10	0.31	0.03	0.02 ± 0.00	0.02	0.02
Acenaphthene	0.01 ± 0.01	0.02	0.01	0.02 ± 0.04	0.08	0.01	0.01 ± 0.02	0.10	0.01	0.01 ± 0.01	0.02	0.01	<LOD		
Acenaphthylene	0.01 ± 0.01	0.04	0.01	0.17 ± 0.19	0.35	0.01	0.10 ± 0.06	0.66	0.01	0.02 ± 0.01	0.04	0.01	0.01 ± 0.01	0.02	0.01
Anthracene	0.06 ± 0.03	0.17	0.02	0.16 ± 0.12	0.27	0.03	0.14 ± 0.06	0.65	0.01	0.04 ± 0.02	0.09	0.01	0.02 ± 0.00	0.02	0.02
Fluorene	0.08 ± 0.02	0.18	0.02	0.33 ± 0.36	0.73	0.01	0.30 ± 0.19	1.10	0.01	0.08 ± 0.03	0.13	0.03	0.07 ± 0.02	0.09	0.06
Phenanthrene	0.49 ± 0.13	1.24	0.21	1.40 ± 1.59	3.50	0.09	0.81 ± 0.21	2.03	0.21	0.28 ± 0.07	0.39	0.19	0.50 ± 0.02	0.52	0.47
Benzo(a)anthracene	0.04 ± 0.02	0.06	0.01	0.06 ± 0.04	0.13	0.02	0.06 ± 0.01	0.47	0.01	0.03 ± 0.01	0.05	0.01	0.02 ± 0.00	0.02	0.02
Chrysene	0.04 ± 0.01	0.07	0.01	0.13 ± 0.16	0.36	0.03	0.06 ± 0.03	0.33	0.01	0.03 ± 0.02	0.06	0.01	0.03 ± 0.00	0.03	0.03
Fluoranthene	0.14 ± 0.09	0.31	0.06	0.15 ± 0.07	0.25	0.09	0.19 ± 0.04	0.57	0.04	0.09 ± 0.05	0.18	0.04	0.12 ± 0.06	0.17	0.08
Pyrene	0.14 ± 0.07	0.26	0.07	0.23 ± 0.10	0.35	0.10	0.20 ± 0.06	0.45	0.09	0.13 ± 0.07	0.21	0.02	0.10 ± 0.02	0.11	0.09
Benzo-a-pyrene	0.02 ± 0.01	0.05	0.01	<LOD			0.03 ± 0.01	0.13	0.01	0.08 ± 0.02	0.23	0.01	0.03 ± 0.01	0.05	0.01
Benzo-b-fluoranthene	0.06 ± 0.01	0.07	0.05	0.02 ± 0.02	0.04	0.01	0.05 ± 0.02	0.21	0.01	0.06 ± 0.02	0.09	0.03	0.03 ± 0.01	0.04	0.03
Benzo-k-fluoranthene	0.01 ± 0.01	0.02	0.01	0.04 ± 0.04	0.09	0.01	0.04 ± 0.10	0.45	0.01	0.01 ± 0.01	0.03	0.01	0.01 ± 0.00	0.01	0.01
Dibenzo(a,h)anthracene	<LOD			0.01 ± 0.00	0.01	0.01	0.01 ± 0.02	0.10	0.01	<LOD			<LOD		
Benzo(g,h,i)perylene	0.02 ± 0.01	0.05	0.01	0.04 ± 0.05	0.10	0.01	0.06 ± 0.02	0.33	0.01	<LOD			<LOD		
Indeno(1,3,c,d)pyrene	<LOD			0.01 ± 0.01	0.03	0.01	0.02 ± 0.05	0.25	0.01	0.04 ± 0.02	0.12	0.01	<LOD		
<i>TOTAL PCBs (mg /kg⁻¹)</i>	0.64 ± 0.29	1.74	0.14	0.65 ± 0.68	1.64	0.12	0.76 ± 0.07	2.98	0.11	0.74 ± 0.25	1.97	0.19	0.23 ± 0.03	0.25	0.21
PCB8	<LOD			<LOD			<LOD			<LOD			<LOD		
PCB20	0.01 ± 0.01	0.02	0.01	<LOD			0.02 ± 0.01	0.17	0.01	0.02 ± 0.01	0.09	0.01	0.05 ± 0.03	0.09	0.01
PCB28	0.01 ± 0.01	0.02	0.01	0.01 ± 0.00	0.01	0.01	0.02 ± 0.01	0.09	0.01	0.01 ± 0.01	0.06	0.01	<LOD		
PCB35	0.27 ± 0.10	1.35	0.01	0.31 ± 0.54	1.12	0.01	0.18 ± 0.05	1.55	0.01	<LOD			<LOD		
PCB52	<LOD			<LOD			0.03 ± 0.01	0.40	0.01	0.01 ± 0.00	0.01	0.01	<LOD		
PCB77	<LOD			<LOD			<LOD			<LOD			<LOD		
PCB 81	0.01 ± 0.01	0.03	0.01	<LOD			<LOD			<LOD			<LOD		
PCB101	0.01 ± 0.01	0.02	0.01	0.01 ± 0.00	0.01	0.01	0.12 ± 0.05	1.53	0.01	0.42 ± 0.12	1.86	0.01	<LOD		
PCB105	<LOD			<LOD			0.01 ± 0.00	0.02	0.00	<LOD			<LOD		
PCB114	0.06 ± 0.02	0.19	0.01	<LOD			0.10 ± 0.25	1.09	0.01	0.05 ± 0.08	0.19	0.01	<LOD		
PCB118	<LOD			<LOD			0.01 ± 0.01	0.05	0.01	<LOD			<LOD		
PCB123	0.01 ± 0.00	0.01	0.01	0.02 ± 0.03	0.06	0.01	0.01 ± 0.01	0.06	0.01	<LOD			<LOD		
PCB126	<LOD			<LOD			<LOD			<LOD			<LOD		
PCB138	0.01 ± 0.01	0.02	0.01	0.01 ± 0.01	0.02	0.00	0.02 ± 0.01	0.07	0.01	0.03 ± 0.01	0.10	0.01	0.01 ± 0.01	0.02	0.01
PCB153	0.11 ± 0.02	0.30	0.01	0.20 ± 0.19	0.40	0.01	0.16 ± 0.09	1.33	0.01	0.09 ± 0.11	0.32	0.01	0.04 ± 0.02	0.06	0.02
PCB156	0.01 ± 0.00	0.01	0.01	<LOD			<LOD			<LOD			<LOD		
PCB157	0.01 ± 0.01	0.02	0.01	0.02 ± 0.02	0.05	0.01	0.01 ± 0.01	0.04	0.01	<LOD			<LOD		
PCB167	<LOD			<LOD			<LOD			<LOD			<LOD		
PCB169	<LOD			<LOD			<LOD			<LOD			<LOD		
PCB180	0.10 ± 0.20	0.46	0.01	0.01 ± 0.01	0.02	0.01	0.05 ± 0.02	0.35	0.01	0.04 ± 0.02	0.18	0.01	0.04 ± 0.01	0.08	0.01
PCB189	<LOD			<LOD			<LOD			<LOD			<LOD		

Results are given as mean ± standard deviation. MAX: maximum; MIN: minimum. LOD: Limit of Detection. Different superscripts in the same column indicate significant differences at (p < 0.05), while the same superscripts (or absence) show that differences are not significant (p > 0.05). Limit values for the organic compounds included in the 3rd Draft of Working Document on Sludge are: ΣNPE: 50 mg kg⁻¹ dm; Σ9 PAH: 6 mg kg⁻¹ dm; Σ7 PCB: 0.8 mg kg⁻¹ dm and PCDD/F: 100 ng TE kg⁻¹ dm.

Table 4 (cont.)

	NDMD			AeDMD			AnDMD			AnDTD			AnDC		
	MEAN ± SD	MAX	MIN	MEAN ± SD	MAX	MIN	MEAN ± SD	MAX	MIN	MEAN ± SD	MAX	MIN	MEAN ± SD	MAX	MIN
<i>TOTAL NPE</i> (mg kg ⁻¹)	22.3 ± 14.2	36.7	5.10	99.0 ± 30.2	166	21.5	67.9 ± 20.7	470	1.26	28.5 ± 19.4	78.3	0.15	42.9 ± 2.55	44.7	41.1
4NPE	2.96 ± 1.75	6.24	0.05	6.35 ± 12.4	25.1	0.05	21.5 ± 7.5	56.6	0.05	13.3 ± 6.3	35.1	0.05	22.8 ± 11.5	30.9	14.6
4NPE-mono-etox	17.0 ± 8.8	27.6	3.85	89.8 ± 63.7	164	20.1	42.4 ± 12.8	455	0.05	8.52 ± 2.24	21.8	0.05	16.7 ± 11.1	25.9	7.40
4NPE-di-etox	2.25 ± 1.29	4.29	1.20	2.75 ± 3.54	8.00	0.28	4.0 ± 1.38	12.7	0.28	6.69 ± 1.42	24.0	0.05	3.48 ± 0.96	4.16	2.80
<i>TOTAL PBDEs</i> (mg kg ⁻¹)	0.21 ± 0.08	0.30	0.10	0.40 ± 0.16	0.60	0.26	0.22 ± 0.13	0.58	0.09	0.32 ± 0.11	1.45	0.07	0.09 ± 0.01	0.09	0.08
PBDE28	<LOD			<LOD			<LOD			0.01 ± 0.00	0.02	0.01	<LOD		
PBDE47	0.04 ± 0.02	0.11	0.01	0.03 ± 0.01	0.10	0.00	0.02 ± 0.04	0.20	0.01	0.01 ± 0.01	0.04	0.01	<LOD		
PBDE66	<LOD			0.01 ± 0.00	0.01	0.01	<LOD			<LOD			<LOD		
PBDE85	<LOD			0.01 ± 0.01	0.02	0.01	<LOD			<LOD			<LOD		
PBDE99	0.03 ± 0.02	0.08	0.01	0.11 ± 0.05	0.18	0.07	0.04 ± 0.04	0.17	0.01	0.01 ± 0.01	0.04	0.01	0.03 ± 0.01	0.04	0.02
PBDE100	<LOD			<LOD			<LOD			<LOD			<LOD		
PBDE138	<LOD			0.01 ± 0.01	0.02	0.01	<LOD			<LOD			<LOD		
PBDE153	<LOD			0.01 ± 0.01	0.02	0.01	<LOD			<LOD			<LOD		
PBDE154	<LOD			<LOD			0.01 ± 0.01	0.04	0.01	<LOD			<LOD		
PBDE183	<LOD			<LOD			0.01 ± 0.03	0.13	0.01	0.02 ± 0.01	0.08	0.01	<LOD		
PBDE209	0.10 ± 0.09	0.25	0.02	0.20 ± 0.06	0.44	0.13	0.11 ± 0.10	0.38	0.01	0.24 ± 0.12	1.40	0.01	0.01 ± 0.01	0.02	0.01
<i>TOTAL PCN</i> (mg kg ⁻¹)	0.04 ± 0.03	0.09	0.02	0.04 ± 0.02	0.05	0.02	0.13 ± 0.11	0.79	0.02	0.39 ± 0.17	1.78	0.02	0.02 ± 0.00	0.02	0.02
1-Chloronaphthalene	0.02 ± 0.01	0.07	0.01	0.01 ± 0.01	0.03	0.01	0.06 ± 0.03	0.77	0.01	0.01 ± 0.00	0.02	0.01	<LOD		
1,4-Dichloronaphthalene	0.01 ± 0.01	0.02	0.01	<LOD			<LOD			0.12 ± 0.11	0.83	0.01	<LOD		
1,2,3,4-Tetrachloronaphthalene	<LOD			0.01 ± 0.01	0.03	0.01	<LOD			<LOD			<LOD		
Octacloronaphthalene	<LOD			<LOD			0.05 ± 0.03	0.52	0.01	0.26 ± 0.10	0.95	0.01	<LOD		
<i>PFOS</i> (µg kg ⁻¹)	<LOD			<LOD			6.69 ± 1.75	26.0	2.50	<LOD			5.25 ± 3.89	8.00	2.50
<i>PFOA</i> (µg kg ⁻¹)	<LOD			<LOD			6.25 ± 1.71	23.0	2.50	<LOD			5.25 ± 3.89	8.00	2.50

Results are given as mean ± standard deviation. MAX: maximum; MIN: minimum. LOD: Limit of Detection; NPE: nonylphenol. Different superscripts in the same column indicate significant differences at (p < 0.05), while the same superscripts (or absence) show that differences are not significant (p > 0.05). Limit values for the organic compounds included in the 3rd Draft of Working Document on Sludge are: ΣNPE: 50 mg kg⁻¹ dm; Σ9 PAH: 6 mg kg⁻¹ dm; Σ7 PCB: 0.8 mg kg⁻¹ dm and PCDD/F: 100 ng TE kg⁻¹ dm.

recommended value (99.0 and 67.9 mg/kg respectively). Notwithstanding, that threshold must be taken as provisional. In the scientific literature, a wide range of NPE concentrations has been observed in sludge samples worldwide (Koh et al., 2009), being usual the occurrence of NPEs in levels higher than the recommended limit of 50 mg/kg (González et al., 2010). It has been also stated that some organic compounds such as nonylphenols, increase after digestion and after composting, probably due to the loss of organic matter which takes place in those treatments (Koh et al., 2009; González et al., 2010). On the other hand, mean PBDE concentrations did not show significant

differences between groups; values ranged from 0.09 mg/kg in compost samples, to 0.40 mg/kg in AeDMD samples. These levels fall well within the typical range found in the scientific literature corresponding to typical PBDE concentrations in sewage sludge (Daso et al., 2011). In Spain, De la Torre et al. (2011) recently reported a mean PBDE concentration of 0.488 mg/kg (range: 0.057-2.606 mg/kg) in 120 sludge samples from a number of WWTPs. The PBDE congener profile was dominated by the heaviest BDE-209, with contribution percentages of up to 75% (AnDTD samples), which was in agreement with literature data (Eljarrat et al., 2008; De la Torre et al., 2011). PCN concentrations, which ranged from 0.02 to 0.39 mg/kg, were also very similar to the levels previously reported by UK researchers (Stevens et al., 2003), who found a range of 0.05-0.19 mg/kg. Finally, perfluorinated compounds (PFCs) were undetected in many samples, with a few exceptions corresponding to AnDMD and AnDC treatment processes. Among PFCs, PFOS has been identified as the most contributive. Our results would be relatively low in comparison to previous studies recently performed in Spain (Llorca et al., 2011; Navarro et al., 2011).

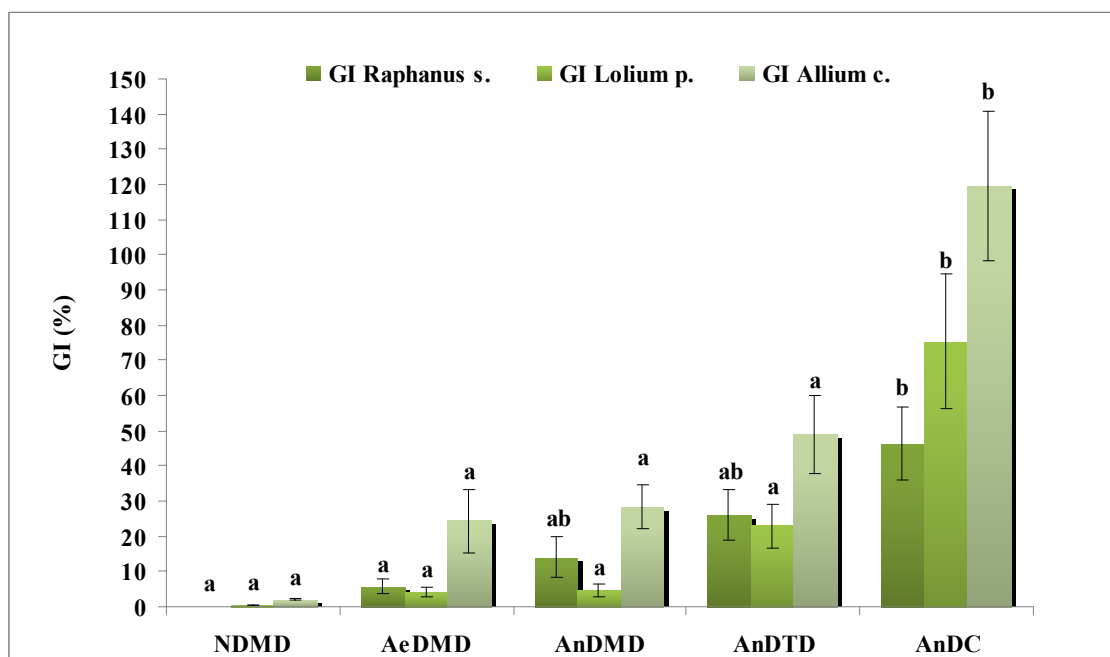


Figure 2.: Ecotoxicity results. GI: Germination index in *Raphanus sativa*, *Lolium perenne* and *Allium cepa*.

Regarding sludge ecotoxicity, the same treatments obtained similar results across toxicity tests (Fig. 2). In general, phytotoxicity and bacteria toxicity decreased with the degree of the sludge stabilization. The least toxic treatment was composting, followed

by thermal drying for plants and bacteria. According to Zucconi et al. (1985), $GI \geq 80\%$ indicates no presence of phytotoxic substances; GI between 50-80% indicates moderate toxicity, $GI \leq 50\%$ indicates high toxicity and values greater than 100% shows a beneficial effect on seed growth, indicating a mature amendment (Komilis and Tziouvaras, 2009). Taking into account these criteria, it must be emphasized that a high phytotoxic effect was noted for all sludge treatments, except for composting, being a clear indication that the use of not entirely stabilized sludge for agricultural purposes could reduce crop production of sensitive species. Within the group of higher plants, *Raphanus sativus* was found to be the most sensitive species. *Vibrio fischeri* inhibition (Microtox[®] assay), is widely accepted as a good indicator of the environmental impact of certain wastes and leachates produced by human activity (Fuentes et al., 2006; Roig et al., 2011). The fact that organic extracts showed more toxicity than aqueous extracts demonstrates that organic and non-polar compounds present in sludge exhibits more toxicity than the soluble ones. Anyhow, significant differences between the toxicity of compost samples and the rest of treatments were noted ($p < 0.05$), being especially evident in Microtox[®] results (Fig. 3). This low eco- and phyto toxicity of compost samples compared with other sewage sludges was also observed by other authors (Fuentes et al., 2006; Ramírez et al., 2008).

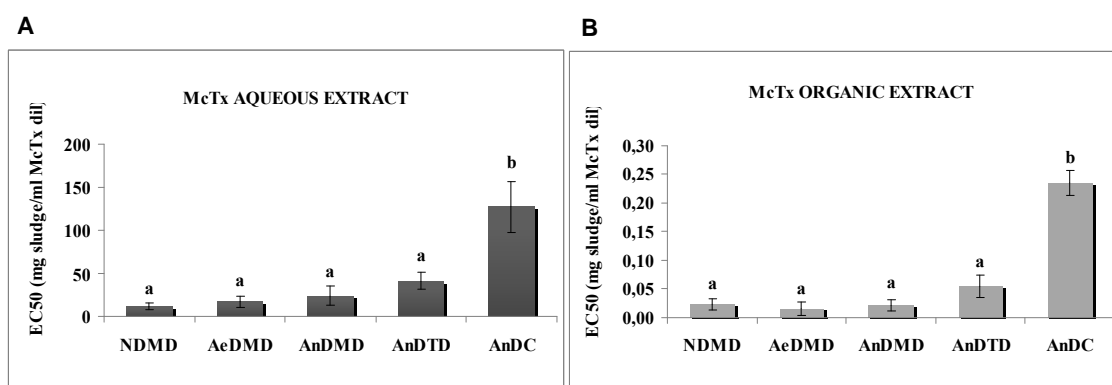


Figure 3. **A)** McTx Aqueous extract: EC₅₀ obtained with Microtox test in aqueous extract. **B)** McTx organic extract: EC₅₀ obtained in Microtox test in organic extract. Units are given in mg sludge/ ml Microtox diluent. Different superscripts show significant differences at $p < 0.05$.

To discriminate the effect of sludge treatment on its chemical and ecotoxicity properties, as well as to establish potential relations between ecotoxicity parameters and physico-chemical and chemical parameters, a correlation analysis with the whole set of samples ($n=28$) was performed. Significant correlations are shown in Table 5. Generally speaking, sludge treatment is related positively and significantly with dryness ($p <$

0.01), negatively on the sludge respiration activity ($p < 0.01$) and, therefore, positively on the sludge organic matter stability. The sludge treatment also correlated positively ($p < 0.01$) with the Germination Indexes of all plants assayed, as well as with EC_{50} values from the Microtox[®] assay ($p < 0.01$ in aqueous extract and $p < 0.05$ in organic extracts). Consequently, the sludge treatment process would influence significantly on its toxicity, being the compost the less toxic. In turn, sludge treatment had a low influence on the presence of specific organic pollutants, except for two PBDE congeners ($p < 0.01$ for #47 and $p < 0.05$ for #209), total PBDEs and phenolic compounds ($p < 0.01$), that are also related with organic matter maturity (positive correlation with all stability parameters). These results contrast with those of Oleszczuk (2009), who reported that sophisticated treatments like composting were good methods to reduce pollutant content in sludge samples, and particularly PAHs with low molecular weight. Komilis and Tziouvaras (2009) used GI as maturity indices to study the relationship with stability indices of compost samples, detecting that low microbial respiration leads to a low phytotoxicity/high maturity (Komilis and Tziouvaras, 2009). Similar results were also obtained in the present study, where a significant negative correlation between both variables was found ($p < 0.01$). Moreover, no correlation was found between GI and salinity, and metal content. Paradelo et al. (2010) observed that the water soluble concentrations of heavy metals in compost are generally too low to produce a toxic response in the conditions of a germination test. On the other hand, in agreement with the results of Hachicha et al. (2009), only phenolic compounds showed certain influence on phytotoxicity ($p < 0.01$). Phenolic compounds can also have antimicrobial and phytotoxic properties (Bustamante et al., 2008). It's important to say that immature organic matter not only contains free phenolic compounds but also other compounds as organic acids of low molecular weight as acetic, propionic, butyric and isobutyric can be phytotoxic (Pascual et al., 1997). Additionally, the findings of Ramírez et al. (2008) were very similar to those of the present study, with a lack of association between

Table 5
 Spearman correlations between physico-chemical properties, organic matter stability and pollutant concentrations.

	Sludge treatment	DM	pH	EC ₂₅	% OC	OM as LOI	mg O ₂ dry g ⁻¹	mg O ₂ g ⁻¹ LOI h ⁻¹	GI <i>Raphanus s.</i>	GI <i>Lolium p.</i>	GI <i>Allium c.</i>	EC ₅₀ McTx aqu.extr.	EC ₅₀ McTx org. extr.
Sludge treatment		.560**							.475**	.525**	.518**	.445**	.330*
DM	.560**				-.331*	-.511**	-.378*					.363*	
pH													
EC₂₅			-.445**		.339*				.485**	.453**	.491**	.408*	
% OC		-.331*				.902**			-.393*		-.342*	-.465**	
LOI	-.496**	-.511**				.902**	.474**		-.471**		-.455**	-.544**	
N	-.727**	-.447*					.726**	.782**	-.527*	-.472*		-.642**	
C/N	.485*						-.454*	-.473*					
P				.428*	.518*	.568*							
K						.449*							
Ca							-.604**	-.645**		.557*	.704**	.531*	
Mg				.470*									
mg O₂ dry g⁻¹	-.754**	-.378*				.474**		.964**	-.703**	-.682**	-.610**	-.661**	
mg O₂ g⁻¹ LOI h⁻¹	-.730**						.964**		-.661**	-.733**	-.603**	-.625**	
Fe					.468*	.539*							
Cr				-.574**									
Cu	.579**						-.597**	-.574**					
Zn		.434*			-.443*	-.439*							
1-Chloronaphthalene		-.670**									-.343*		
Octachloronaphthalene					-.498**	-.443*			.364*		.449**		
Total PCN		-.355*											
Anthracene		-.349*				.347*					.329*		-.344*
Benzo(a)anthracene						.349*			-.351*			-.340*	
Benzo(g,h,i)perylene			-.328*				.344*	.366*	-.485**		-.334*		
Benzo(a)pyrene	.406*	.450**			-.341*	-.433*	-.404*	-.362*					
Fluoranthene					.339*		.350*		-.329*			-.384*	
Indeno(1.2.3..c.d)pyrene					-.362*				.378*	.336*	.519**	.332*	-.392*

phytotoxicity and inorganic/organic pollutant content, and a high correlation between toxicity and physico-chemical properties. No significant correlation was found between ecotoxicity and metal levels. A lower toxicity of compost samples compared with non-digested or aerobic digested sludge could be explained by the volatilization, degradation, and/or the binding of pollutants to the organic matrix during composting process, as by the increase of the cationic exchange capacity in the composted wastes (Ramírez et al., 2008). It is known that only the bioavailable fraction of the pollutants may negatively influence organisms (Oleszczuk, 2008a). It has been also observed a lack of association between concentration of pollutants analyzed and toxicity values in *Folsomia candida* bioassay, while significant correlations with physico-chemical properties were present (Domene et al., 2007, 2008). Oleszczuk (2008b) reported a lack of connection between PAH content and the ecotoxicological results. In consequence, the global ecotoxicity of sewage sludges could be more influenced by the stabilization degree and/or the content of phenolic compounds and other compounds related to non-mature organic matter rather than due to the presence of other toxicants, such as metals or POPs (Déportes et al., 1995; Domene et al., 2008; Fuentes et al., 2006; Ramírez et al., 2008; Wong et al., 2001).

4. Conclusion

The results of the current investigation corroborate that the sludge treatment has influence on some sludge properties (dry matter, organic matter stability, nitrogen), its toxicity to plants and bacteria and, in a lesser extent, the presence of some organic pollutants (phenols and PBDEs). The post-treatment that best stabilized organic matter was composting, followed by thermal drying. Regarding sludge digestion processes, anaerobic treatment seems to be better than the aerobic ones. Untreated sludges showed the highest toxicity for all bioassays. Therefore, composting is the most adequate treatment for the safe use of sludge in land application. Composting was proven to increase the dry matter content and organic matter stability, while it decreased the amount of nitrogen, the concentration of some specific pollutants (i.e., phenolic compounds) and the toxicity on plant and bacteria (from 2 to 5 times less toxic than other treatments). However, no correlation between the contaminant burden (with the exceptions of some PAHs and PCBs) and the ecotoxicity could be found. Ecotoxicity of sewage sludge seems to be more related to the presence of compounds (e.g., phenols) in

fresh organic matter, as a direct consequence of the maturity degree, rather than with the content of other inorganic (metals) and organic (POPs) contaminants. The use of ecotoxicological tests and respirometric methods, together with the analysis of free phenols, are here proposed as suitable preliminary tests to assess the organic matter stabilization of sewage sludges, which could be safely disposed on agriculture, if properly controlled.

Aknowledgements

This study was financially supported by the Ministry of Science and Innovation, Spain, through grant No. CTM2007-64490, and the SOSTAQUA project, funded by CDTI in the framework of the Ingenio 2010 Program under the CENIT call.

References

- Andrés P, Mateos E, Tarrasón D, Cabrera C, Figuerola B. Effects of digested, composted, and thermally dried sewage sludge on soil microbiota and mesofauna. *Appl Soil Ecol* 2011;48: 236-42.
- Banerjee MR, Burton DL, Depoe S. Impact of sewage sludge application on soil biological characteristics. *Agric Ecosyst Environ* 1997;66:241-49.
- Barrena R, d'Imporzano G, Ponsá S, Gea T, Artola A, Vázquez F, et al. In search of a reliable technique for the determination of the biological stability of the organic matter in the mechanical-biological treated waste. *J Hazard Mater* 2009;162:1065-72.
- BOE. Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Spain, 1990 [in Spanish]
- Box JD. Investigation of Folin - Ciocalteu phenol reagent for determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Res* 1983;17:511-25.
- Clarke BO, Smith SR. Review of 'emerging' organic contaminants in biosolids and assessment of international research priorities for the agricultural use of biosolids. *Environ Int* 2011;37: 226-47.
- Bright DA, Healey N. Contaminant risks from biosolids land application: Contemporary organic contaminant levels in digested sewage sludge from five treatment plants in Greater Vancouver, British Columbia. *Environ Pollut* 2003;126:39-49.
- Bustamante MA, Paredes C, Marhuenda-Egea FC, Pérez-Espinosa A, Bernal MP, Moral R. Co-composting of distillery wastes with animal manures: Carbon and nitrogen transformations in the evaluation of compost stability. *Chemosphere* 2008;72:551-7.
- California Compost Quality Council. Compost Maturity Index. 2001. Nevada City, CA.

- Dai J, Xu M, Chen J, Yang X, Ke Z. PCDD/F, PAH and heavy metals in the sewage sludge from six wastewater treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere* 2007; 66: 353-361.
- Daso AP, Fatoki OS, Osendaal JP, Olujimi OO. Occurrence of selected polybrominated diphenyl ethers and 2,2',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl (BB-153) in sewage sludge and effluent samples of a wastewater-treatment plant in Cape Town, South Africa. *Arch Environ Contam Toxicol* 2011; in press.
- De la Torre A, Alonso E, Condejero MA, Sanz P, Martínez MA. Sources and behaviour of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) in Spanish sewage sludge. *Waste Manage* 2011;31:1277-84.
- Déportes I, Benoit-Guyod JL, Zmirou D. Hazard to man and the environment posed by the use of urban waste compost: a review. *Sci Total Environ* 1995;172:197-222.
- Domene X, Alcañiz JM, Andrés P. Ecotoxicological assessment of organic wastes using the soil collembolan *Folsomia candida*. *Appl Soil Ecol* 2007;35:461-72.
- Domene X, Ramírez W, Mattana S, Alcañiz JM, Andrés P. Ecological risk assessment of organic waste amendments using the species sensitivity distribution from a soil organisms test battery. *Environ Pollut* 2008;155:227-36.
- EC. Council Directive 91/271/EEC concerning urban waste-water treatment. L135, 30 European Commission, Official Journal, 1991.
- EC. Organic contaminants in sewage sludge for agricultural use. European Commission Joint Research Centre, Institute for Environment and Sustainability, Soil and Waste Unit. UMEG Center for Environmental Measurements, Environmental Inventories and Product Safety, 2001a.
- EC. European Commission. Working document on Biological Treatment of Biowaste. 2nd draft. Brussels, 2001b.
- Eljarrat E, Marsh G, Labandeira A, Barceló D. Effect of sewage sludges contaminated with polybrominated diphenylethers on agricultural soils. *Chemosphere* 2008;71:1079-86.
- EC. Council Directive of 12 June 1986 on the protection of the environments, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture European Commission, 1986.
- EC. Directive 2008/98/EC of the European Parliament and of the Council of 19 November 2008 on waste and repealing certain Directives, 2008.
- Flotats Ripoll X, Campos Pozuelo E, Palatsi Civit J, Illa Alibés J, Solé Mauri F, Magrí Aloy A. Guia dels tractaments de les dejeccions ramaderes. In: Departament d'Agricultura Ramaderia i Pesca AdRdC, editor, 2004 [in Catalan].
- Fuentes A, Lloréns M, Sáez J, Aguilar MI, Pérez-Marín AB, Ortuño JF, et al. Ecotoxicity, phytotoxicity and extractability of heavy metals from different stabilised sewage sludges. *Environ Pollut* 2006;143:355-60.
- García-Delgado M, Rodríguez-Cruz MS, Lorenzo LF, Arienzo M, Sánchez-Martín MJ. Seasonal and time variability of heavy metal content and of its Chemicals forms in sewage sludges from different wastewater treatment plants. *Sci Total Environ* 2007;382 82-92.

- Gea T, Barrena R, Artola A, Sánchez A. Monitoring the biological activity of the composting process: Oxygen uptake rate (OUR), respirometric index (RI), and respiratory quotient (RQ). *Biotechnol Bioeng* 2004;88:520-27.
- Gibson RW, Wang M-J, Padgett E, Lopez-Real JM, Beck AJ. Impact of drying and composting procedures on the concentrations of 4-nonylphenols, di-(2-ethylhexyl)phthalate and polychlorinated biphenyls in anaerobically digested sewage sludge. *Chemosphere* 2007;68:1352-8.
- González MM, Martín J, Santos JL, Aparicio I, Alonso E. Occurrence and risk assessment of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates in sewage sludge from different conventional treatment processes. *Sci Total Environ* 2010;408:563-70.
- Hachicha S, Cegarra J, Sellami F, Hachicha R, Drira N, Medhioub K, et al. Elimination of polyphenols toxicity from olive mill wastewater sludge by its co-composting with sesame bark. *J Hazard Mater* 2009;161:1131-9.
- Harrison EZ, Oakes SR, Hysell M, Hay A. Organic chemicals in sewage sludges. *Sci Total Environ* 2006;367:481-97.
- Hua L, Wu W, Liu Y, Chen Y, McBride MB. Effect of composting on polycyclic aromatic hydrocarbons removal in sewage sludge. *Water Air Soil Pollut* 2008; 193: 259-267
- Koh YKK, Chiu TY, Paterakis N, Boobis A, Scrimshaw MD, Lester JN. Fate and occurrence of alkylphenolic compounds in sewage sludges determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Environ Technol* 2009;30:1415-24.
- Komilis DP, Tziouvaras IS. A statistical analysis to assess the maturity and stability of six composts. *Waste Manage* 2009;29:1504-13.
- Körner I, Braukmeier J, Herrenklage J, Leikam K, Ritzkowski, M, Schlegelmilch M, Stegmann R. Investigation and optimization of composting processes- test systems and practical examples. *Waste Manage* 2003;23;17-26.
- Llorca M, Farré M, Picó Y, Barceló D. Analysis of perfluorinated compounds in sewage sludge by pressurized solvent extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromat A* 2011;1218 4840-6.
- Matsuoka K, Moritsuka N, Masunaga T, Matsui K, Wakatsuki T. Effect of heating treatments on nitrogen mineralization from sewage sludge. *Soil Sci Plant Nutr* 2006;52:519-27.
- Milieu Ltd, WRC, RPA. Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land Final Report. Part I: Overview Report. Study contract DG ENV G4/ETU/2008/0076r, 2008.
- MAGRAMA. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Caracterización de los lodos de depuradoras generados en España. Madrid, 2009 [in Spanish].
- Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL. Levels of metals, PCBs, PCNs and PAHs in soils of a highly industrialized chemical/petrochemical area: Temporal trend. *Chemosphere* 2007;66: 267-76.
- Navarro I, Sanz P, Martínez MA. Analysis of perfluorinated alkyl substances in Spanish sewage sludge by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2011;400:1277-86
- Oleszczuk P. Phytotoxicity of municipal sewage sludge composts related to physico-chemical properties, PAHs and heavy metals. *Ecotoxicol Environ Safety* 2008a;69:496-505.

- Oleszczuk P. Forms of polycyclic aromatic hydrocarbon in the formation of sewage sludge toxicity to *Heterocypris incongruens*. *Sci Total Environ* 2008b;404:94-102.
- Oleszczuk P. Application of three methods used for the evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) bioaccessibility for sewage sludge composting. *Bioresource Technol* 2009;100:413-20.
- Paradelo R, Villada A, Gonzalez D, Barral MT. Evaluation of the toxicity of heavy metals and organic compounds in compost by means of two germination-elongation tests. *Fresen Environ Bull* 2010;19:956-962.
- Pascual JA, Ayuso M, Garcia C, Hernández T. Characterization of urban wastes according to fertility and phytotoxicity parameters. *Waste Manage Res* 1997;15:103-12.
- Ramírez WA, Domene X, Ortiz O, Alcañiz JM. Toxic effects of digested, composted and thermally-dried sewage sludge on three plants. *Bioresource Technol* 2008;99:7168-75.
- Roig N, Nadal M, Sierra J, Ginebreda A, Schuhmacher M, Domingo JL. Novel approach for assessing heavy metal pollution and ecotoxicological status of rivers by means of passive sampling methods. *Environ Int* 2011;37:671-7.
- Ros M, Pascual JA, Garcia C, Hernandez MT, Insam H. Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biol Biochem* 2006;38:3443-52.
- Rovira J, Mari M, Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL. Partial replacement of fossil fuel in a cement plant: Risk assessment for the population living in the neighborhood. *Sci Total Environ* 2010;408:5372-80.
- Sánchez-Monedero MA, Roig A, Cegarra J, Bernal MP. Relationships between water-soluble carbohydrate and phenol fractions and the humification indices of different organic wastes during composting. *Bioresource Technol* 1999;70:193-201.
- Scancar J, Milacic R, Strazar M, Burica O. Total metal concentrations and partitioning of Cd, Cr, Cu, Fe, Ni and Zn in sewage sludge. *Sci Total Environ* 2000;250:9-19.
- Singh R, Agrawal M. Biochemical and physiological responses of rice (*Oryza sativa* L.) grown on different sewage sludge amendments rates. *Bull Environ Contam Toxicol* 2008;84:606-12.
- Smith SR. A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environ Int* 2009;35:142-56.
- Sommers LE. Chemical composition of sewage sludges and analysis of their potential use as fertilizers. *J Environ Qual* 1977;6:225-32.
- Stevens JL, Northcott GL, Stern GA, Tomy GT, Jones KC. PAHs, PCBs, PCNs, organochlorine pesticides, synthetic musks, and polychlorinated n-alkanes in U.K. sewage sludge: Survey results and implications. *Environ Sci Technol* 2003;37:462-7.
- Tas DO. Respirometric assessment of aerobic sludge stabilization. *Bioresource Technology* 2010; 101: 2592-2599.
- USEPA. Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4100 Terrestrial Plant Toxicity, Tier I (Seedling Emergence). EPA 712-C-96-153 April 1996. United States Environmental Protection Agency, 1996.
- USEPA. EPA Method 3546: Microwave extraction of VOCs and SVOCs (organophosphorus pesticides, organochlorine pesticides, chlorinated herbicides, phenoxy acid herbicides, PCBs). Environmental

Protection Agency, Office of Research and Development, National Exposure Research Laboratory, Cincinnati, OH, USA, 2000.

Wong JWC, Li K, Fang M, Su DC. Toxicity evaluation of sewage sludges in Hong Kong. *Environ Int* 2001;27:373-80.

Zucconi F, Monaco A, Forte M, deBertoldi M. Phytotoxins during the stabilization of organic matter. In: Gasser, J.K.R (Ed.), *Composting of Agricultural and Other Wastes*. Elsevier Applied Science Publ., London, 1985, pp. 73-86.

DISCUSSIÓ DEL CAPÍTOL III

Des de la implantació de la directiva europea de tractaments d'aigües (91/271/EEC), la producció de fangs de depuradora a Europa no ha parat de créixer i s'espera que cap al 2020 s'arribin als 13 milions de tones anuals (EC, 2008). Del total de fangs produïts, s'estima que al voltant del 40% (i en alguns països de la Unió Europea fins al 50%) acaben reciclant-se com a esmena orgànica a través de la matriu sòl (EC, 2008), sobretot en països mediterranis on els sòls acostumen a ser pobres en matèria orgànica. Per a dur a terme aquesta pràctica, la legislació espanyola regula únicament el contingut màxim d'elements metàl·lics del fang així com del sòl receptor (BOE, 1990). No obstant, a banda de contenir matèria orgànica, nutrients i elements traça, aquests subproductes també incorporen nivells no negligibles de contaminants orgànics i patògens, que sens dubte poden perjudicar als organismes del sòl receptor i, per tant, afectar al bon funcionament de la matriu sòl. En aquest treball, es proposa analitzar conjuntament el contingut de contaminants (metàl·lics i orgànics) i l'ecotoxicitat. Aquestes anàlisis s'han efectuat amb un grup de 28 mostres de fangs de depuradora que s'han classificat en funció dels tipus de tractament més comú en les EDARs. Així doncs, s'han distingit els fangs digerits per procés aeròbic, dels fangs digerits per processos anaeròbics, fangs únicament assecats mecànicament i fangs assecats mecànicament amb posterior assecat tèrmic, i per últim, fangs compostats. Tenint en compte que l'aportació de fangs al sòl queda restringida als sòls agrícoles, els organismes diana escollits per avaluar la fitotoxicitat han estat 3 plantes d'ús agrícola sensibles a la presència de contaminants: *Raphanus sativus*, *Lolium perenne* i *Allium cepa*. També s'ha estudiat l'ecotoxicitat d'extractes aquosos i orgànics mitjançant el test del Microtox[®] amb *Vibrio fischeri*.

Els resultats corroboren que el tractament aplicat als fangs influeix relativament poc en la càrrega contaminant del fang, tant en la presència de metalls com de contaminants orgànics, exceptuant els PBDE i els compostos fenòlics solubles. Es confirma la hipòtesi que les concentracions de contaminants, sobretot els compostos inorgànics en el residu final, vindran més marcades pel possible origen de les aigües residuals que no pas pel tractament que rebin a la planta depuradora (García- Delgado et al., 2007; Sommers, 1977). En canvi, el tractament rebut influeix significativament en el contingut en matèria seca, nitrogen (baixa en la digestió anaeròbica) i sobretot en el grau d'estabilitat de la matèria orgànica que en aquest treball s'ha proposat valorar-lo

mitjançant tècniques respiromètriques. El grau d'estabilitat dels fangs estudiats augmenta en el sentit següent: fangs assecat mecànicament > fang digerit aeròbiament amb assecat mecànic > fang digerit anaeròbiament amb assecat mecànic > fang digerit anaeròbiament amb assecat tèrmic > fang compostat. No obstant, s'ha observat que els fangs assecats tèrmicament presenten graus d'estabilitat similars als que pot presentar un compost. Els únics contaminants que disminueixen clarament amb la intensitat del tractament han estat els fenols solubles, que s'han valorat mitjançant un mètode colorimètric relativament poc específic, però que ha correlacionat perfectament amb el grau d'estabilitat de la matèria orgànica.

La utilització del **test de germinació** amb raves, cebes i raigràs ha estat adequada per valorar la fitotoxicitat en extractes d'aigua (fracció biodisponible) d'aquests materials, sent el rave l'espècie més sensible. Tanmateix, aquesta tècnica s'ha aplicat durant dècades per valorar el grau de maduresa dels compostos. El bacteri bioluminescent *Vibrio fischeri* ha permès valorar l'ecotoxicitat tant de la fracció hidròfila com lipòfila. Els resultats han mostrat que tant la fitotoxicitat com l'ecotoxicitat van en un mateix sentit, i han correlacionat relativament poc amb la càrrega contaminant analitzada (compostos orgànics i metalls). L'única excepció han estat els fenols solubles. Aquest fet indica que el grau d'estabilitat del residu, marcat pel tipus de processament que rebí a la planta de tractament, influeix més en l'ecotoxicitat i fitotoxicitat del fang que no pas la pròpia càrrega de contaminants d'aquest. És ben conegut que la matèria orgànica fresca conté fenols lliures, però alhora altres compostos com àcids orgànics de baix pes molecular, entre d'altres, els quals poden ser fitotòxics i antibacterians. Els extractes orgànics han presentat novament més toxicitat que els aquosos, fet que podria indicar que els compostos orgànics poden tenir més influència en la toxicitat que els metalls.

Malgrat haver-se observat que els contaminants més recalcitrants (metalls i compostos orgànics persistents) influeixen relativament poc en la toxicitat del fang (Ramírez et al., 2008), és important tenir-los en compte, ja que al aplicar-se al sòl, la matèria orgànica del fang s'anirà mineralitzant alhora que alliberarà els contaminants presents. Aquests es podran acumular a la matriu sòl i biota, provocar efectes tòxics als organismes presents, transferir-se a altres matrius (aigua, aire) o bé transformar-se.

CAPÍTOL IV. SÒLS

RESUM DEL CAPÍTOL IV

En aquest capítol es presenten dos treballs. El primer treball consisteix en un article publicat a la revista *Agriculture, Ecosystems and Environment* on s'han estudiat unes parcel·les experimentals de sòls a Pamplona on s'han aplicat exclusivament fangs de depuradora de forma sistemàtica i ben controlada. El segon treball, és un capítol de llibre editat en el llibre *Soil Enzymology in the Recycling of Organic Wastes and Environmental Restoration* que recull els resultats d'un estudi efectuat en sòls agrícoles de Montroig del Camp que han estat esmenats amb fangs compostats junt amb d'altres tractaments (fertilitzants minerals per exemple) considerats convenients per a cada agricultor. En aquest segon estudi es considera que l'aplicació de fangs s'ha realitzat de forma convencional i s'apropa més a la realitat del dia a dia en la gestió d'aquest tipus de subproductes. En aquests treballs es presenten resultats que aporten informació de com es veuen afectades algunes propietats del sòl referents a la fertilitat i el funcionament d'aquest, l'acumulació de contaminants (metalls) i l'ecotoxicitat derivades de la fertilització (a llarg termini) amb fangs i composts de depuradora.

Resum de l'Article

Efectes a llarg termini de l'aplicació de fangs de depuradora en sòls espanyols: efectes en el funcionament del sòl

El tractament d'aigües residuals genera molts residus sòlids biodegradables. Tenint en compte que aquest fet és un problema ambiental d'interès comú, l'administració pública intenta promoure un tractament sostenible d'aquests residus urbans, com n'és el reciclatge aplicant-se com a adobs en sòls agrícoles. L'objectiu d'aquest treball ha estat analitzar l'aplicació sistemàtica i periòdica al sòl, de fangs de depuradora digerits anaeròbiamment, durant 16 anys, mitjançant l'estudi dels efectes causats sobre les propietats físico-químiques, funcionals i ecotoxicològiques del sòl. Els resultats de l'estudi, han demostrat que l'aportació de fangs millora les propietats del sòl proporcionalment a les dosis d'aplicació i/o freqüència. Els adobs orgànics augmenten el contingut en matèria orgànica (i la seva aromaticitat), el nitrogen del sòl i l'activitat microbiana, millorant-ne la mineralització del carboni i nitrogen i algunes funcions enzimàtiques. No obstant, s'ha obtingut una dosi màxima de $40 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ any}^{-1}$ per sobre de la qual les propietats del sòl no milloren, sinó que fins i tot, empitjoren. Si es té en compte els riscos mediambientals, tot i que no s'hagi observat toxicitat en els bacteris bioluminescents, si que s'haurien de tenir en compte efectes adversos potencials com l'acumulació d'elements potencialment tòxics (metalls i metal·loides), fitotoxicitat i la probabilitat de la contaminació d'aigües subterrànies per nitrats o matèria orgànica soluble. Aquest estudi permet demostrar que s'hauria de millorar i potenciar l'estudi conjunt de paràmetres de funcionament del sòl i efectes toxicològics amb l'anàlisi de contaminants. Estudis d'aquestes característiques permeten fer una valoració més realista dels efectes a llarg termini de l'aplicació de fangs de depuradora en sòls agrícoles.

Long-term amendment of Spanish soils with sewage sludge: Effects on soil functioning

Neus Roig, Jordi Sierra, Esther Martí, Martí Nadal, Marta Schuhmacher, José L.

Domingo

Publicat a Agriculture, Ecosystems and Environment (2012) 158: 41-48

ABSTRACT

Wastewater treatment processes generate highly biodegradable solid wastes. As their fate is an environmental issue of great concern, public administrations promote a sustainable management of urban wastes. The objective of the present study was to analyze the systematic and periodical use, for 16 years, of anaerobically digested sewage sludge as an agricultural fertilizer by assessing the effects on some soil physical-chemical, functional, and ecotoxicological properties. The results showed that the input of sludge enhances soil properties proportionally to the application doses and/or frequency. The organic amendments increased the organic matter content (and its aromaticity), the soil nitrogen, and the microbial activity, improving carbon and nitrogen mineralization processes and some enzymatic functions. However, a maximum dose was identified ($40 \text{ Mg ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$), beyond which soil properties do not improve, and may even worsen. Regarding environmental risks, although the bioluminescent bacteria test showed no toxicity on soil extracts, potential adverse effects such as some potentially toxic elements accumulation, phytotoxicity and the likelihood of groundwater pollution by nitrates or dissolved organic matter should be taken into account. The complementarity of studying soil functioning parameters and ecotoxicological effects, together with the analysis of pollutant content, must be enhanced. This assures a more realistic assessment of long-term effects of sewage sludge-amended soils.

1. Introduction

The total quantity of sewage sludge production in the EU27 is currently estimated in more than 10 million tons (dry solids), of which nearly 40% is spread on land for agricultural use. Agriculture recycling of sewage sludge varies greatly among Member States (Milieu Ltd., 2008). In Spain, sewage sludge generation has significantly increased in recent years (64% in the period 1999-2005), 65% of sewage sludge is recycled through agricultural soils (MMA, 2008). Although this proportion may be similar across the EU, the situation is different in certain countries (Milieu Ltd., 2008) such as the Netherlands, where the development of stringent policies has actually resulted in an effective ban on using sewage sludge for agriculture. Alternatively, sewage sludge may be differently used. Some of these options are land reclamation, horticulture and landscaping, industrial processes, or energy recovery (Alabaster and Leblanc, 2008; Rovira et al., 2011).

Sewage sludges are composed mainly of organic matter, nutrients, pollutants, and micro- and mesofauna. Amending soil with these materials improves soil properties such as organic matter, nutrients content, soil porosity, bulk density, aggregate stability, and water holding capacity (Singh and Agrawal, 2008; Annabi et al., 2011). Sewage sludge materials, as organic amendments, cause initial enhancement in the soil microbial activity and biomass, as well as in the soil biochemical activity, due to higher organic matter and nutrients availability (Marschner et al., 2003). Mediterranean agricultural soils are poor in organic matter. Therefore, the use of this type of materials may be a good option for the management of these wastes. Among the beneficial aspects, the amelioration of soil physicochemical and nutritional properties has been reported (Singh and Agrawal, 2008). Moreover, the International Panel on Climate Change (IPCC) recognizes that over the past few centuries (especially the recent one), agricultural soils have lost more than one-half of their organic matter. Returning carbon in the form of sludge, animal manures, and composts could improve soil quality and crops while reducing carbon in the atmosphere (Soriano-Disla et al., 2010; Powlson et al. 2011).

There are some drawbacks derived from this practice (Achiba et al., 2009; Ipolito et al., 2009). The persistence and accumulation of Persistent Organic Pollutants (POPs) and Potentially Toxic Elements (PTE) from sewage sludge may have notable consequences for the quality of the human food chain, plant health, and soil microbial

processes (Smith 2009; Passuello et al., 2010). Unfortunately, guidelines and legislation often refer to total contaminant burdens, while they do not consider information on what proportion of this total amount may be biologically available to organisms (Alvarenga et al., 2007; Barral and Paradelo, 2011). With regard to this, the application of complementary techniques, as toxicity bioassays (i.e., germination tests), are recommended methods for the assessment of ecological risks in soils or other matrices (Alvarenga et al., 2007; Roig et al., 2011). As the disposal of sewage sludge on agricultural fields may result in an increase of the pollutants concentration in soil, the optimization in the dose and frequency of application to avoid an overload of contamination and the health and environmental risks derived (Passuello et al., 2012), is clearly desirable. Besides agronomic criteria, environmental restrictions play a role in the practical application of sewage sludge. Oleszczuk (2006) stated that the preferred method should be a one-year system, with a sludge application of $\leq 75 \text{ Mg ha}^{-1}$, allowing the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contained in the sludge. For preventing water pollution by nitrates, a long-term rate application of 22 Mg per ha and year could be sustainable (Jin et al., 2011). Regarding possible ecotoxicological effects, Domene et al. (2008) estimated that the safe amendment rates of anaerobic sewage sludges should be between 2.7 and 13.9 Mg per ha, and Carbonell et al. (2009) observed different toxicity levels when applying sewage sludge, starting on 30 Mg per ha in a mesocosm study.

This study was aimed at assessing the effects of a repetitive application of sewage sludge for 16 years in a controlled field experiment. Physico-chemical characteristics, metals content, soil functioning properties related to carbon and nitrogen cycles, enzymatic activities, ecotoxicological tests and plant growth ratios were closely studied. Furthermore, the risk of aquifer contamination by nitrates or organic matter was also considered. Finally, the optimal dose and frequency of sewage sludge application was established in terms of lack of ecological risks.

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

The field study was carried out in wheat experimental fields in Pamplona (N of Spain). Sewage sludge was produced in an urban wastewater treatment plant, with primary and secondary treatments. Sewage sludge was stabilized through anaerobic

digestion and mechanical dewatering. Sewage sludge characteristics are summarized in Table 1. The soil used was clay- loam-textured (31% clay, 30% silt, 39% sand), rich in carbonates (24%), poor in organic matter (1% oxidizable carbon), and alkaline pH, corresponding to a Calcaric Fluvisol (FAO-UNESCO, 1998). The experimental field consisted of different plots, where sewage sludge had been

Table 1
 Sewage sludge characteristics.

Physico-chemical characteristics		PTE concentrations (mg kg ⁻¹)		Levels of organic pollutants	
Dry matter	20-25 %	Zn	800-900	PCNs (mg kg ⁻¹)	0.04-0.07
Organic matter	50-60 % dm	Pb	100-150	PAHs (mg kg ⁻¹)	1.41-5.63
C/N	7-10	Cu	200-300	PBDEs (mg kg ⁻¹)	0.08-0.32
pH	7.5-8.0	Cr	100-150	PCBs (mg kg ⁻¹)	0.26-1.35
N _t	3.0-3.5 %	Ni	40-60	NPE (mg kg ⁻¹)	4.27-321
P ₂ O ₅	5.0-6.0 %	Cd	<0.1	PFOS (µg kg ⁻¹)	ND-10.5
K ₂ O	0.5-0.6 %	Hg	<0.1	PFOA (µg kg ⁻¹)	ND
MgO	0.7-0.8 %				
CaO	10.0-12.0 %				

ND: no detected; PTE: Potentially toxic elements; N_t: Total Kjeldahl Nitrogen; PCN: polychlorinated naphthalenes; PAHs: polycyclic aromatic hydrocarbons; PBDEs: polybrominated diphenyl ethers; PCBs: polychlorinated biphenyls; NPE: nonylphenol ethoxylates; PFOS: perfluorooctane sulfonate; PFOA: Perfluorooctanoic acid.

Table 2
 Details of the amending plan and treatment references.

Treatment	Sludge Mg ha ⁻¹ year ⁻¹	Frequency	Total Applications	Total amount sewage sludge (Mg ha ⁻¹)
C	0 (Control)	-	-	-
CM	0 (Control + mineral fertilizer)	Every year	-	-
40/4	40	Every 4 years	4	160
40/2	40	Every 2 years	8	320
40/1	40	Every year	16	640
80/4	80	Every 4 years	4	320
80/2	80	Every 2 years	8	640
80/1	80	Every year	16	1280

continuously applied for 16 years (from 1993 to 2009) at different doses and frequency (eight treatments in total) (Table 2). Thirty-two composite soil samples (depth: 0-25 cm) were collected from 16 plots, each covering a surface a 35 m², in a completely randomized block design. Four different samples were taken from each different treatment. Control soils without sewage sludge or fertilizer, and conventional mineral amendment were included. Mineral fertilization was done by the application of

80 kg P ha⁻¹, before sowing, and 180 kg N ha⁻¹, divided into two applications along the wheat growing period. Soil sampling was carried out in July 2009, at least 6 months after applying sewage sludge.

2.2. Physico-chemical parameters of soil samples

Soil properties were determined by the usual soil characterization methods (Page et al., 1982). The pH in 1N KCl (1:2.5) and pH and electrical conductivity (EC₂₅) in aqueous extracts (1:2.5) were measured. Oxidizable organic carbon was determined by the Walkley-Black method. Total Kjeldahl Nitrogen (TKN) was determined by Kjeldahl digestion followed by ammonia distillation. Mineral nitrogen fractions were determined in 1N KCl 1:10 extracts of the soils, and quantified by distillation (N-NH₄⁺), and colorimetrically (NO₃⁻), the latter according to US EPA method 352.1. The dissolved organic carbon (DOC) was analyzed in 0.01N CaCl₂ soil 1:5 extracts, determining the total organic carbon (TOC) by means of a Multi N/C 3100 analyzer (with prior removal of inorganic carbon with HCl). In order to assess the organic matter quality (aromaticity degree), the specific absorbance of UV (SUVA₂₅₄) was measured by means of a UV-Vis spectrophotometer according to US EPA (2005). Soluble phenolic compounds were analyzed in a 0.01N CaCl₂ extract soil (ratio 1:5) and subsequently determined by the colorimetric method of Folin-Ciocalteu (Sierra et al., 2007). For potentially toxic elements analysis, 0.5 g dried soil samples were treated with HNO₃ (65% Suprapur, E. Merck, Darmstadt, Germany) in a Milestone Start D Microwave Digestion System (Milestone Srl, Bergamo, Italy) for 10 min until reaching 165°C, and kept at this temperature for 20 min. After cooling, the extracts were made up to 25 mL with ultrapure water. The analytical determination was performed by means of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) for As, Cd, Cr, Cu, Hg and Pb, and inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (ICP-OES) for Mn, Ni and Zn. Blanks, control samples, and certified reference materials (CRM 052, loamy clay, Resource Technology Corporation US,) were used for quality control/quality assurance (Nadal et al., 2011). The recovery percentages of standards ranged from 62 to 91%.

2.3. Biochemical and ecotoxicological parameters

For the microbial activity assessment, soil samples (25 g) were incubated in manometric respirometers, which allow the determination of the sample oxygen consumption (Oxitop[®] OC 110, WTW GmbH, Weilheim, Germany). Samples were kept at 25°C in the darkness, in an incubator equipped with a thermostat for 21 days. Oxygen consumption was periodically monitored. Cumulative respiration (CR) was determined by the cumulative oxygen consumption at the end of the incubation period. Once the incubation was completed, substrate induced respiration (SIR) was determined according to the OECD 216 carbon transformation test method (OECD, 2000a). Briefly, an aqueous solution equivalent to 4000 mg glucose per kg of soil was added to the incubated samples, and the oxygen consumed during the subsequent 12 h was determined. Basal respiration (BR) rate was estimated as the average hourly respiration rate over the last 5 days of incubation when the respiration was stable. The respiratory activation quotient (Q_R) was calculated, dividing BR by SIR (OECD, 2000b; ISO, 2002). Nitrogen mineralization potential was quantified by the OECD 217 method (OECD, 2000b). According to it, soil samples with added alfalfa meal and H₂O (equivalent to the 50% of the soil water holding capacity) were incubated at 25°C for 28 days. Once completed, nitrates were determined in 0.1N KCl extracts according to the US EPA method 352.1 (US EPA, 1971). Urease activity (UA) was quantified by the method of Kandeler and Gerber (1988), based on the determination of ammonia released during the incubation of soil at 37°C for 2 h. Dehydrogenase activity (DH) was determined according to García et al. (2003). A germination elongation test was performed to assess the phytotoxicity of the amended soils. The test was done by using *Allium cepa* (onion) and *Raphanus sativus* (radish) seeds (monocotyledon and dicotyledon, respectively), using 5 seeds per pot (soil amount: 15 g), in quadruplicates. After 14-28 days, the plants shoot lengths were measured according to OECD guideline 208 (OECD, 2006). Bacterial (*Vibrio fischeri*) bioluminescence inhibition acute bioassays (Microtox[®]) were conducted on soil NaCl 2% aqueous extracts (1:2) following the 90% basic test for aqueous extracts protocol (Azur Environmental, 1999).

2.4. Data treatment

Statistical analysis of the data was done by means of SPSS 13.0 (SPSS Inc., Chicago, USA). In order to determine the statistical significance of the differences between soil treatments and controls, an ANOVA followed by Duncan's *post-hoc* test

($p < 0.05$) was executed on the results of the experiments. Complementarily, Pearson correlations were applied to determine the relationships between variables.

3. Results

Data from the physicochemical characterization of soil samples subjected to different treatments (sewage sludge amended and controls) are shown in Table 3. No significant differences were noted between the different treatments regarding pH-H₂O values. Despite that, a slight tendency to boost the acidification of soils was observed when sewage sludge was applied.

Table 3
 Physicochemical characterization of the soil control and treated samples.

	C	MC	40/4	40/2	80/4	40/1	80/2	80/1
Total SS (Mg ha ⁻¹)	0	0	160	320	320	640	640	1280
pH _{H2O}	7.67	7.69	7.66	7.67	7.62	7.52	7.59	7.56
pH _{KCl}	7.33 ^d	7.32 ^{cd}	7.16 ^{ab}	7.14 ^{ab}	7.21 ^{bc}	7.22 ^{bcd}	7.28 ^{cd}	7.10 ^a
EC ₂₅ (μS cm ⁻¹)	214 ^a	202 ^{ab}	263 ^d	227 ^{bc}	240 ^c	263 ^d	280 ^d	270 ^d
Cox (%)	0.98 ^a	0.98 ^a	1.14 ^b	1.08 ^b	1.09 ^b	1.12 ^b	1.22 ^b	1.28 ^c
N _t (% N)	0.07	0.07	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09
C/N	14.1	14.2	14.8	13.7	13.9	15.2	14.1	14.6
NH ₄ ⁺ - N (mg kg ⁻¹)	17.9	19.1	18.9	19.9	22.2	17.6	15.2	18.1
NO ₃ ⁻ - N (mg kg ⁻¹)	8.60 ^a	10.1 ^a	15.3 ^b	13.7 ^b	19.4 ^c	18.6 ^c	22.9 ^c	18.7 ^d
DOC (mg kg ⁻¹)	59.8 ^{ab}	57.2 ^a	65.4 ^{bc}	64.9 ^{bc}	69.7 ^{cd}	65.0 ^{bc}	69.5 ^{cd}	72.9 ^d
SUVA (254nm)	1.44 ^a	1.47 ^{ab}	1.68 ^d	1.63 ^d	1.59 ^{cd}	1.65 ^d	1.54 ^{bc}	1.69 ^d
Phenols (mg kg ⁻¹)	1.32 ^b	1.20 ^{ab}	1.53 ^{bc}	1.53 ^{bc}	1.70 ^c	1.66 ^c	1.45 ^{bc}	1.74 ^c

Different superscripts indicate significant differences at $p < 0.05$. SS: sewage sludge; EC: Electrical conductivity; Cox: oxidizable carbon; N_t: Total Kjeldahl Nitrogen; DOC: dissolved organic carbon; SUVA: Specific UV absorbance. Treatment references are defined in Table 2

The pH-KCl results showed a tendency to acidification of the soil exchange complex in the sewage sludge amended samples, contrasting with the mineral control. The amendment with sewage sludge produced an increase of the EC₂₅ values. However, it did not imply the salinization of soil (EC₂₅ < 4000 μS cm⁻¹). The organic carbon concentrations and total nitrogen in the samples increased with the application of sewage sludge, whereas the mineral fertilization did not affect organic carbon concentrations of soil. No significant differences in N-NH₄⁺ levels between the amended and control soils were found. Extractable nitrates concentrations were significantly higher in all sewage sludge treatments than in the control and mineral fertilizer plots. The concentrations of DOC and SUVA₂₅₄ values, as well as phenolic

compounds concentrations, increased in the sewage sludge amended samples. Table 4 summarizes the concentrations of potentially toxic elements in soils. The levels of Hg, Mo, Zn, Cu, Cr and Pb were significantly higher in amended soils than in control plots. In turn, no differences were observed between both control sites (with or without mineral amendment). Furthermore, potentially toxic elements levels were well below the regulatory limits set by national and international guidelines.

The carbon mineralization process was, in general, enhanced by the long-term application of sewage sludge, especially regarding SIR parameters (Fig. 1). Nitrogen mineralization also increased significantly in all the amended samples (sewage sludge and mineral). The tested enzymatic activities showed that, although DHA tended to increase in most cases, UA was not significantly affected by the amendment (Fig. 2). Regarding the *A. cepa* germination-elongation test, the sewage sludge application produced a decrease in the germination-elongation rates, being this diminution only significant in the treatments 40/1 (40 Mg ha⁻¹ per year), 80/2 (80 Mg ha⁻¹ every two years) and 80/1 (80 Mg ha⁻¹ per year). In contrast, the sewage sludge amendment did not produce a clear effect on germination-elongation of *R. Sativus* (Fig. 3). Finally, no differences between amended samples and controls were observed in the Microtox[®] test results, as none of the treatments showed toxic levels (EC₅₀>1000 mg soil mL⁻¹ extract).

Table 4
 Total potentially toxic elements concentrations (mg kg⁻¹ dw) in the soil control and treated samples.

Ref	C	MC	40/4	40/2	80/4	40/1	80/2	80/1	86/278/EC Directive	EU Working Document*
Total SS (Mg ha ⁻¹)	0	0	160	320	320	640	640	1280		
Cd	0.243 ^a	0.255 ^a	0.267 ^a	0.274 ^{ab}	0.245 ^a	0.317 ^b	0.239 ^a	0.279 ^{ab}	40	2
Hg	0.057 ^a	0.053 ^a	0.126 ^{cd}	0.093 ^b	0.060 ^a	0.106 ^{bc}	0.093 ^b	0.143 ^d	25	2
Co	8.90 ^{bc}	8.65 ^{ab}	8.90 ^{bc}	8.90 ^{bc}	8.20 ^a	8.95 ^c	8.35 ^a	8.45 ^{ab}	-	-
Mo	0.11 ^a	0.12 ^a	0.15 ^b	0.13 ^{ab}	0.15 ^b	0.15 ^b	0.15 ^b	0.18 ^c	-	-
Ni	21.6 ^{abc}	21.4 ^{ab}	22.6 ^d	22.3 ^{cd}	21.2 ^{ab}	22.8 ^d	21.1 ^a	22.1 ^{bcd}	400	100
Pb	19.6 ^a	19.7 ^a	23.7 ^c	22.8 ^{bc}	19.8 ^a	22.6 ^{bc}	21.1 ^{ab}	24.2 ^c	1200	200
Cr	14.7 ^a	14.8 ^a	17.5 ^c	16.6 ^b	15.0 ^a	17.4 ^c	16.1 ^b	18.4 ^d	-	600
As	6.4 ^{bc}	6.3 ^{ab}	6.8 ^d	6.7 ^{cd}	6.6 ^{bcd}	6.6 ^{bcd}	6.0 ^a	6.5 ^{bcd}	-	-
Cu	18.3 ^a	18.3 ^a	23.6 ^d	22.7 ^{cd}	20.2 ^b	22.8 ^{cd}	21.8 ^c	26.3 ^d	1750	600
Zn	62.7 ^a	60.7 ^a	86.3 ^d	79.4 ^c	56.3 ^b	80.9 ^{cd}	79.1 ^c	96.6 ^e	4000	1500

Different superscripts indicate significant differences at p<0.05. Treatment references are defined in Table 2.
 *EC, 2000.

4. Discussion

When the correlations between parameters were analyzed (Electronic Supplementary Material), it was observed that the acidification of the exchange complex (pH-KCl) might be related to the organic matter mineralization (C and N mineralization) due to sewage sludge application. Significant correlations were noted ($p < 0.01$) between the decrease of pH-KCl and the organic matter mineralization (CR, SIR, N mineralization, DHA). Since the area of study was a carbonate rich soil capable to buffer the free acidity in the soil solution, the acidification could not be seen in the H₂O extracts. A pH decrease effect of long-term sewage sludge application was also observable in acidic soils with lower buffering ability, as previously reported (Enwall et al., 2007). The differences between pH-H₂O and pH-KCl showed a tendency to the salinization in the controls (base saturation of the soil exchange complex). This trend seemed to be compensated by the application of sewage sludge. The pH-KCl decrease showed a stronger correlation with the total amount of sewage sludge than with the dose or the number of applications. However, the increase in the EC₂₅ was better correlated with the dose (0, 40 or 80 Mg ha⁻¹) than with the number of applications or total amount used.

In accordance with the results of previous experiments (Marschner et al., 2003), after the addition of organic material, most treatments showed an increase in the levels of organic matter, total nitrogen and nitrate, when compared to the respective controls. The dissolved organic matter (DOC) increased in the amended soil, in agreement with the results from recent investigations (Chiu and Tian, 2011; Sierra et al., 2012). The aromaticity (SUVA 254 values) of the soluble organic matter increases with its maturity degree (Surampalli and Tyagi, 2004), showing an improvement in the quality of the DOC (Jaffrain et al., 2007). This leads to an increase of the soil ability to adsorb organic pollutants (de Paolis and Kukkonen, 1997). Among the aromatic constituents, free phenolic compounds play an important role in the synthesis of soil humic substances (Sánchez-Monedero et al., 1999) and also they allow some reactivity to the organic matter, which helps to face up an eventual pollution episode. Although these compounds may have a notable degree of phytotoxicity and antimicrobial activity (Souto et al., 2000), they did not hinder soil microbial activity in our experiment. In addition, this type of compounds tends to get biodegraded and/or incorporated to the soil organic matter in soils amended with high phenolic content organic wastes (Sierra

et al., 2007). In the current investigation, soils presented a high degree of aromaticity, as it can be deduced from $SUVA_{254}$ results which also presented stronger correlations with the number of applications than with the total amount of sewage sludge deposited. In turn, phenolic compounds concentration showed a better correlation with the doses rather than with the number of applications. Moreover, whereas for the organic carbon increase the most influential factor seemed to be the total amount of sewage sludge used, the main factor influencing the DOC levels was the application dose. Nitrates increase was found to be especially correlated with the sewage sludge dose. Nitrate production is related to the N mineralization process, which is also enhanced by the addition of sewage sludge. In the present case-study, the nitrogen added in the applications 40/1 (40 Mg ha⁻¹ per year), 80/2 (80 Mg ha⁻¹ every two years) and 80/1 (80 Mg ha⁻¹ per year) would be equivalent to 280, 280 and 560 kg N ha⁻¹, respectively. Between the 80/4 and 40/2, both bringing the same amount of N to the soil, nitrates were significantly higher when the nominal dose was also higher (Table 2). Consequently, organic amendments should be preferably applied at lower doses distributed over time in order to achieve a sustained mineral nitrogen supply and to minimize the nitrate losses, which may contaminate groundwater and misspend the nitrogen source.

With the only exception of As, the concentrations of all the elements were correlated with the number of applications and/or with the total amount of sludge applied. Although the levels of some elements were found to be significantly higher in the amended soils than in the controls, metal concentrations were still well below the threshold values established by different regulations such as those from Spain, the Netherlands and Canada (VROM, 2000; Ministerio de la Presidencia, 2005; CCME, 2007) for the protection of the environment and human health. Furthermore, according to the FOREGS geochemical database (Rodríguez Lado et al., 2008), the concentrations here found are near and even below the median of the corresponding geographical area, with only Hg exceeding that level, but remaining far below the Dutch target values (VROM, 2000).

Regarding the carbon mineralization experiments, no correlations were found between BR and sewage sludge application. BR is an indicator of the current biological activity, which remains stabilized once the labile carbon source is exhausted, and the microbiota is adapted to the conditions of the incubation. This depends on the microbiota and nutritional state of the soil. SIR has been found to be related to the

active microbial biomass (Blagodatsky et al. 2000; Svensson and Friberg 2007; Bradford et al. 2009; Hultgren et al. 2009), being often used as an indicator of both microbial biomass and toxicity in soils (Martí et al., 2007, 2011). The current results show a clear increase in the soil SIR due to the sewage sludge effect, which means that the active microbial biomass remains enhanced after relative long-term application of sewage sludge materials, showing a lack of toxicity in the amended soils, even considering the pollutants load and the time elapsed since the application. However, long-term potential effects associated to the increase of organic matter could appear and, therefore, they should be taken into account (Montserrat et al., 2006). SIR was especially favored by repeated applications of sewage sludge.

With respect to Q_R , it measures the relationship between the activity of microbiota and the number of active microorganisms, being an indicator of soil microbiota stress. Q_R values above 0.3 may indicate soil microbiota stress in polluted soils (ISO, 2002). Such scenario was not observed in the current experiment (Fig. 1), as Q_R was far below 0.3, with the highest value corresponding to the mineral amending. In previous studies, some relationship (negative correlations) was reported between BR/SIR ratios (Q_R) and pH (Enwall et al., 2007). It has been suggested that stress can be attributed to the acidity, as well as to the consequences of this acidity on the PTE availability. Although in the present study Q_R values correlated positively with pH ($r=0.636$, $p<0.01$), there were no observable differences compared to the control. This might be due to the slightly alkaline pH that limits PTE bioavailability.

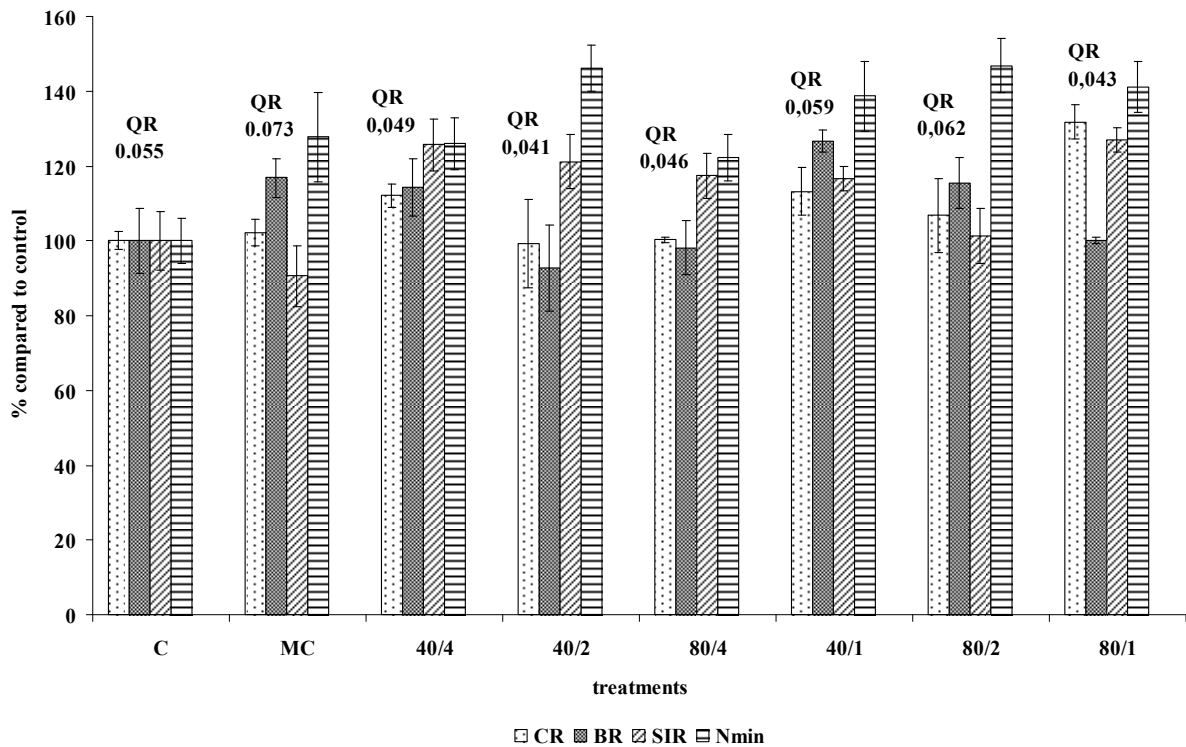


Figure 1. Carbon and Nitrogen mineralization. CR: cumulative respiration; BR basal respiration; SIR: substrate induced respiration; Nmin: Nitrogen mineralization. QR: Respiratory Activation Quotient. CR, BR, SIR and Nmin expressed as percentages related to the control soil. Different treatments are defined in Table 2

Regarding enzymatic activities, urease activity was not significantly affected by the amendment with sewage sludge, while dehydrogenase activity increased significantly with the number of sewage sludge applications (Fig. 2). In general, soil enzymatic activity is proportional to soil organic carbon content (Marschner et al., 2003), being in agreement with the current DHA results. The soil UA tends to increase with the organic matter application, becoming inhibited due to the presence of metals, as reported in some works (Tejada et al., 2011). In the present investigation, the UA was not significantly altered, so the expectable organic matter effect was not produced, or maybe it was counteracted by the presence of toxicity. In fact, if UA is expressed as UA to organic matter ratio, inhibitions compared to the control are highlighted, as they increased with the waste application. In relation to this, it must be noted that the correlation analysis shows that Co, Ni and As levels were negatively and significantly correlated with UA.

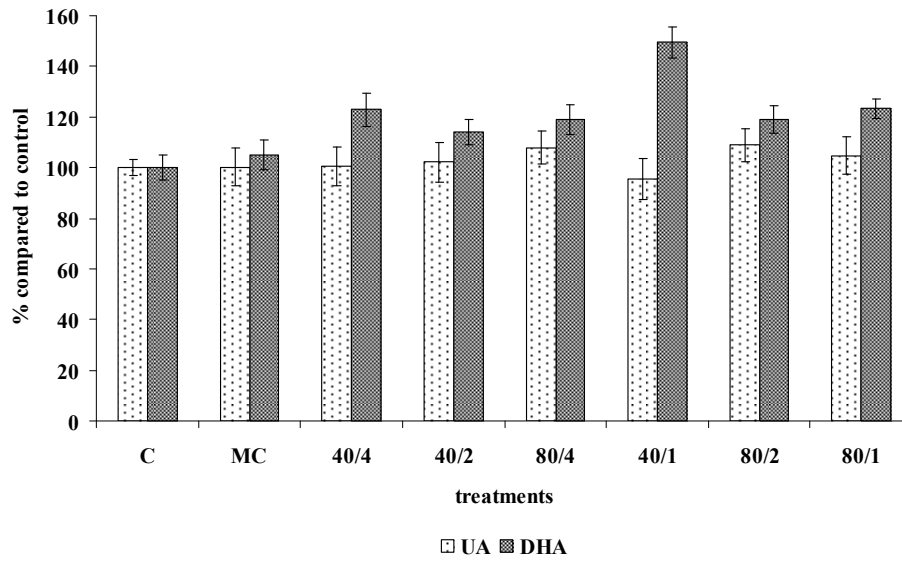


Figure 2. Enzymatic activities of the samples expressed as percentages related to the control soil. UA: Urease activity; DHA: dehydrogenase activity. Different treatments are defined in Table 2.

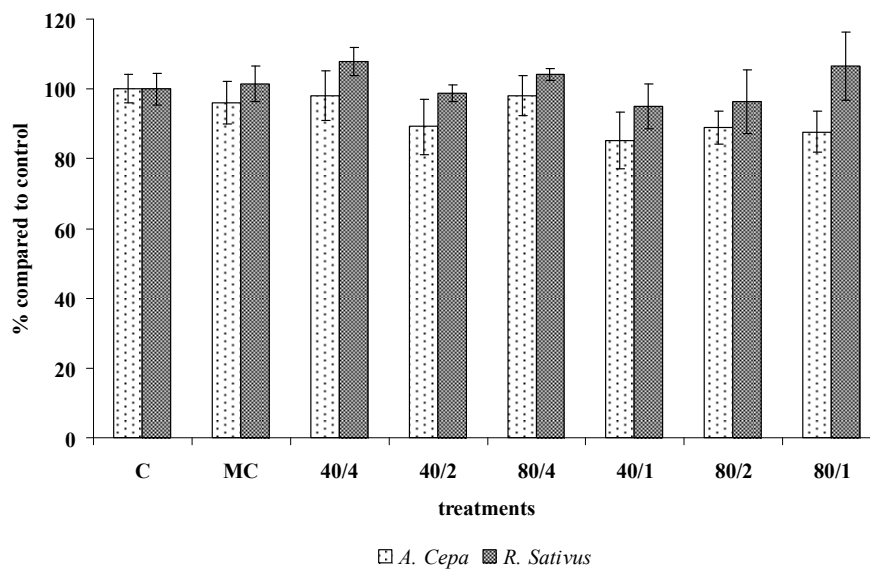


Figure 3. Germination-elongation results expressed as percentages to the control for *Allium cepa* and *Raphanus sativus*. Different treatments are defined in Table 2.

Finally, the amendment with sewage sludge did not derive in toxicity on *R. sativus*. In contrast, the growth of *A. cepa* was significantly lower ($p < 0.05$) in the highest application doses than in the control (Fig. 3). Additionally, the germination results with *A. cepa* correlated negatively with Cd, Hg, Pb, Cr, Cu and Zn concentrations, as well as the levels of free soluble phenols, which may exert phytotoxic properties. The inhibition of growth would be more related to the number of applications and total amount of sewage sludge than to the dose.

According to the current results, and despite the low profile of the differences between treatments, it seems that a biannual application of 40 Mg/ha could be recommended. This is based on the effects found on some parameters (differences between KCl and H₂O pH, C/N ratio, balance between ammonium/nitrate forms, soluble phenolic compounds, Q_R), but mainly on the fact that the number of applications (for the same total amount added) showed the highest correlations for some important parameters (i.e., potentially toxic elements concentrations and phytotoxicity). The accumulation of metals in soils due to the treatments, considering that the experiment lasted 16 years, still remained in a level similar to that of the background ones (Rodríguez Lado et al., 2008) and below the target values of some regulations as it has been stated above.

5. Conclusions

The application for 16 years of sewage sludge to a calcareous soil resulted in an increase in the acidity of the soil exchange complex, an improvement in the soil organic matter (C and N) and microbial activity and nitrogen mineralization potential, as well as in an increase in the soil organic matter aromaticity and the amount of soluble phenolic compounds. A varied range of increases in the PTE total concentrations was observed, although the levels reached did not exceed the statutory limits in any of the evaluated scenarios.

Some toxicity trends could be observed in the phytotoxicity test (*Allium cepa*) related to Cd and in the urease activity (when expressed as relative to oxidizable carbon content) related to Co, Ni and As concentrations. Sewage sludge amendment at any dose (40 or 80 Mg ha⁻¹ year⁻¹) was found not causing toxicity for C mineralization microorganisms. The results show that, for the same amount of sewage sludge used, the distribution along time of small doses is better than single applications because it increases soil fertility minimizing negative environmental impacts as ecotoxicity and soluble nitrate losses.

Overall, our findings highlight the importance of performing complementary studies, when evaluating the long-term effects derived from sewage sludge-amended soils. In order to interpret a realistic scenario, the analysis of pollutant contents is not sufficient, as this must be applied in combination to studies of soil functioning parameters and/or ecotoxicological tests.

Acknowledgements

This study was financially supported by the project CTM2007-64490-TECNO, Spanish Ministry of Science and Technology, and the SOSTAQUA project, funded by CDTI in the framework of the Ingenio 2010 Program under the CENIT call. Authors thank Pedro Navalon and Sandra Blazquez for their collaboration in this study.

References

- Achiba, W.B., Gabteni, N., Lakhdar, A., Laing, G.D., Verloo, M., Jedidi, N., Gallali, T., 2009. Effects of 5-year application of municipal solid waste compost on the distribution and mobility of heavy metals in a Tunisian calcareous soil. *Agric. Ecosyst. Environ.* 130, 156-163.
- Alabaster, G.P., Leblanc, R.J., 2008. Global atlas of excreta, wastewater, sludge, and biosolids management: moving forward the sustainable and welcome uses of a global resource. In: Le Blanc, R.J., Matthews, R., Richard, R.P. (Eds). *United Nations Settlement Program*, pp. 344 - 550. Nairobi, Kenya.
- Alvarenga, P., Palma, P., Gonçalves, A.P., Fernandes, R.M., Cunha-Queda, A.C., Duarte, E., Vallini, G., 2007. Evaluation of chemical and ecotoxicological characteristics of biodegradable organic residues for application to agricultural land. *Environ. Int.* 33, 505-513.
- Annabi, M., Le Bissonnais, Y., Le Villio-Poitrenaud, M., Houot, S. 2011. Improvement of soil aggregate stability by repeated applications of organic amendments to a cultivated silty loam soil. *Agric. Ecosyst. Environ.* 144, 382-389.
- Azur Environmental, 1999. *Microtox Omni*[®] software for windows 95/98/NT. Carlsbad, CA, USA.
- Barral, M.T., Paradelo, R., 2011. Trace elements in compost regulation: The case of Spain. *Waste Manage.* 31, 407-410.
- Blagodatsky, S.A., Heinemeyer, O., Richter, J., 2000. Estimating the active and total soil microbial biomass by kinetic respiration analysis. *Biol. Fertil. Soil.* 32, 73-81.
- Bradford, M.A., Wallenstein, M.D., Allison, S.D., Treseder, K.K., Frey, S.D., Watts, B.W., Davies, C.A., Maddox, T.R., Melillo, J.M., Mohan, M.R., Reynolds, J.F., 2009. Decreased mass specific respiration under experimental warming is robust to the microbial biomass method employed. *Ecol. Lett.* 12, E15-E18.
- CCME, 2007. *Canadian Soil Quality Guidelines for the Protection of Environmental and Human Health*. Canadian Council of Ministers of the Environment. Winnipeg, Canada.
- Carbonell, G., Pro, J., Gómez, N., Babin, M.M., Fernández, C., Alonso, E., Tarazona, J.V. 2009. Sewage sludge applied to agricultural soil: Ecotoxicological effects on representative soil organisms. *Ecotoxicol. Environ. Safety* 72, 1309-1319
- Chiu, C.Y., Tian, G., 2011. Chemical structure of humic acids in biosolids-amended soils as revealed by NMR spectroscopy. *Appl. Soil. Ecol.* 49, 76-80.

- De Paolis, F., Kukkonen, J., 1997. Binding of organic pollutants to humic and fulvic acids: influence of pH and the structure of humic material. *Chemosphere* 34, 1693-1704.
- Domene, X., Ramírez, W., Mattana, S., Alcañiz, J.M., Andrés, P., 2008. Ecological risk assessment of organic waste amendments using the species sensitivity distribution from a soil organisms test battery. *Environ. Pollut.* 155, 227-236.
- EC, 2000. Working Document on Sludge. Third Draft, Brussels 27 April 2000, DG. Environment, 18 pp.
- EC, 2001. Disposal and Recycling Routes for Sewage Sludge. Scientific and technical sub-component report. DG Environment-B/2. European Commission. Luxembourg.
- Enwall, K., Nyberg, K., Bertilsson, S., Cederlund, H., Stenström, J., Hallin, S., 2007. Long-term impact of fertilization on activity and composition of bacterial communities and metabolic guilds in agricultural soil. *Soil Biol. Biochem.* 39, 106-115.
- FAO-UNESCO, 1998. World Reference Base for Soil Resources. Food and Agriculture Organization of the United Nations. World Soil Resources Reports. International Society of Soil Science. Rome, Italy.
- García, C., Gil, F., Hernández, M.T., Trasar, C. (Eds.), 2003. Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medidas de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid [in Spanish].
- Hultgren, J., Pizzul, L., Castillo, M.P., Granhall, U., 2009. Degradation of PAH in a creosote-contaminated soil. A comparison between the effects of willows (*Salix viminalis*), wheat straw and a nonionic surfactant. *Int. J. Phytorem.* 12, 54 - 66.
- Ippolito, J.A., Barbarick, K.A., Brobst, R.B., 2009. Fate of biosolids Cu and Zn in a semi-arid grassland. *Agric. Ecosyst. Environ.* 131, 325-332.
- ISO, 2002. Soil quality. Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves. ISO guideline 17155. International Organization for Standardization. Geneva, Switzerland.
- Jaffrain, J., Gérard, F., Meyer, M, Ranger, J., 2007. Assessing the quality of dissolved organic matter in forest soils using Ultraviolet Absorption Spectrophotometry. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 71, 1851-1858.
- Jin, V.L., Johnson, M.V.V., Haney, R.L., Arnold, J.G. 2011. Potential carbon and nitrogen mineralization in soils from a perennial forage production system amended with class B biosolids. *Agric. Ecosyst. Environ.* 141, 461-465.
- Kandeler, E., Gerber, H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biol. Fert. Soil.* 6, 68-72.
- Marschner, P., Kandeler, E., Marschner, B., 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment. *Soil Biol. Biochem.* 35, 453-461.
- Martí, E., Sánchez, M., Sierra, J., Cruañas, R., Garau, M.A., 2007. Ecotoxicological tests assessment of soils polluted by chromium (VI) and pentachlorophenol. *Sci. Total Environ.* 378, 53-57.
- Martí, E., Sierra, J., Cáliz, J., Montserrat, G., Vila, X., Garau, M.A., Cruañas, R., 2011. Ecotoxicity of chlorophenolic compounds depending on soil characteristics. *Sci. Total Environ.* 409, 2707-2716.
- Milieu Ltd. WRc and RPA , 2008. Environmental. economic and social impacts of the use of sewage sludge on land Final Report .Part I: Overview Report. Study contract DG ENV G4/ETU/2008/0076r.

- Ministerio de la Presidencia, 2005. Real Decreto 9/2005 de 14 de enero por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados. Boletín Oficial del Estado pp. 1833-1843. Madrid, Spain [in Spanish].
- MMA, 2008. Borrador del Plan Nacional integrado de Residuos 2007-2015. Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. Madrid, Spain [in Spanish].
- Montserrat, G., Martí, M., Sierra, J., Garau, M.A., Cruañas, R., 2006. Discriminating inhibitory from enhancing effects in respirometry assays from metal polluted-sewage sludge amended soils. *Appl. Soil Ecol.* 34, 52-61.
- Nadal, M., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., 2011. Long-term environmental monitoring of persistent organic pollutants and metals in a chemical/petrochemical area: Human health risks. *Environ. Pollut.* 159, 1769-1777.
- OECD Organization for Economic Cooperation and Development. 2000a. Soil Microorganisms. Carbon Transformation Test. OECD guideline 216. Paris, France.
- OECD Organization for Economic Cooperation and Development. 2000b. Soil Microorganisms. Nitrogen Transformation Test. OECD guideline 217. Paris, France.
- OECD Organization for Economic Cooperation and Development. 2006. Terrestrial plants test. Seedling emergence and seedling growth test. OECD guideline 208. Paris, France.
- Oleszczuk, P., 2006. Persistence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in sewage sludge-amended soil. *Chemosphere* 65, 1616-1626.
- Page, A.L., Miller, R.H., Kenney, D.R., 1982. *Methods of Soils Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties.* 2nd Ed. Agronomy series n. 9. ASA. SSSA. Madison, Wisconsin. USA.
- Passuello, A., Mari, M., Nadal, M., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., 2010. POP accumulation in the food chain: integrated risk model for sewage sludge application in agricultural soils. *Environ. Int.* 36, 577-83.
- Passuello, A., Cadiach, O., Perez, Y., Schuhmacher, M., 2012. A spatial multicriteria decision making tool to define the best agricultural areas for sewage sludge amendment. *Environ. Int.* 38, 1-9.
- Powlson, D.S., Whitmore, A.P., Goulding, K.W.T., 2011. Soil carbon sequestration to mitigate climate change: a critical re-examination to identify the true and the false. *European Journal of Soil Science* 62, 42-55.
- Rodríguez Lado, L., Henil, T., Reuter, H.I., 2008. Heavy metals in European soils: A geostatistical analysis of the FOREGS Geochemical database. *Geoderma*, 148, 189-199.
- Roig, N., Nadal, M., Sierra, J., Ginebreda, A., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., 2011. Novel approach for assessing heavy metal pollution and ecotoxicological status of rivers by means of passive sampling methods. *Environ. Int.* 37, 671-677
- Rovira, J., Mari, M., Nadal, M., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., 2011. Use of sewage sludge as secondary fuel in a cement plant: human health risks. *Environ. Int.* 37, 105-111.
- Sanchez-Monedero, M.A., Roig, A., Cegarra, J., Bernal, M.P., 1999. Relationships between water-soluble carbohydrate and phenol fractions and the humification indices of different organic wastes during composting. *Bioresour. Technol.* 70, 193-201.

- Singh, R.P., Agrawal, M., 2008. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Manage.* 28, 347-358.
- Sierra, J., Martí, M., Garau, M.A., Cruañas, R., 2007. Effects of the agronomic use of olive oil mill wastewater: Field experiment. *Sci. Total Environ.* 378, 90-94.
- Sierra, J., Roig, N., Martí, E., Nadal, M., Schuhmacher, M., 2012. Amendment of soils with composted sewage sludge. Long term effects on C and N transformation. In: *Soil Enzymology in the Recycling of Organic Wastes and Environmental Restoration*. Trasar-Cepeda, C., Hernández, T., García, CV., Rad, C., González Caicedo, S. (Eds.) *Environmental Science and Engineering Part II*, pp 271-282. Springer Verlag Berlin Heideberg. Berlin, Germany.
- Smith, S.R., 2009. A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environ. Int.* 35, 142-156.
- Soriano-Disla, J.M., Navarro-Pedreño, J., Gómez I., 2010. Contribution of a sewage sludge application to the short-term carbon sequestration across a wide range of agricultural soils. *Environ. Earth Sci.* 61, 1613-1619.
- Souto, X.C., Chiapusio, G., Pellissier, F., 2000. Relationships between phenolics and soil microorganisms in spruce forests: significance for natural regeneration, *J. Chem. Ecol.* 26, 2025-2034.
- Surampalli, R.K., Tyagi, K.D., 2004. *Advances in water and wastewater treatment*. American Society of Civil Engineering. USA, pp. 529.
- Svensson, K., Friberg, H., 2007. Changes in active microbial biomass by earthworms and grass amendments in agricultural soil. *Biol. Fertil. Soil.* 44, 223-228.
- Tejada, M., Parrado, J., Hernández, T, García, C., 2011. The biochemical response to different Cr and Cd concentrations in soils amended with organic wastes. *J. Hazard. Mater.* 185, 204-211.
- US EPA, 1971. Nitrogen, Nitrate (Colorimetric, Brucine). EPA method 352.1. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, OH.
- US EPA, 2005. Determination of total organic carbon and specific UV absorbance at 254 nm in source water and drinking water. EPA method 415.1. EPA/600/R-05/055. U.S. Environmental Protection Agency. Cincinnati, OH.
- VROM. 2000. Ministerial Circular on Target and Intervention Values for Soil Remediation. Reference DBO/1999226863. Ministry of Housing, Spatial Planning and the Environment: Bilthoven, The Netherlands.

Resum del capítol de llibre

Fertilització de sòls amb fangs de depuradora compostats. Efectes a llarg termini en la transformació del carboni i el nitrogen.

En el treball que es presenta a continuació, es pretén avaluar els efectes de l'ús convencional de l'aplicació de compost de fangs de depuradora en cinc sòls agrícoles que contenen diferents cultius. L'estudi s'ha centrat en l'estudi de les propietats químiques, bioquímiques i ecotoxicològiques del sòl relacionades amb la mineralització de la matèria orgànica i l'activitat microbiana. Per a aquesta fi, s'analitzà el pH, la conductivitat elèctrica, l'absorbància UV específica₂₅₄, amoni i nitrats, i l'activitat de la deshidrogenasa i ureasa. L'activitat microbiana del sòl s'estudià mitjançant anàlisis de respirometria (respiració acumulada, respiració basal, respiració induïda per substrat i el quocient d'activació respiratòria) i mitjançant l'estudi de nitrificació potencial, segons els estàndards OECD. Tots els anàlisis es realitzaren passats un mínim de 6 mesos des de la última aplicació de fang, per tal d'evitar l'avaluació de la millora inicial dels paràmetres que produeix un aport recent de matèria orgànica. Els resultats de l'estudi mostraren que l'aplicació convencional de compost de fang de depuradora millora algunes de les propietats del sòl, com ara el contingut en matèria orgànica soluble i la mineralització del carboni, amb un increment general en l'activitat microbiana i la biomassa activa i una davallada en els quocients d'activació respiratòria en la majoria de sòls. No obstant, també s'observà una tendència a augmentar els nivells d'amoni i nitrats dels sòls tractats, així com una davallada de la relació C/N que representaria cert perill per la contaminació dels aqüífers per nitrats. A l'Annex II es mostren els continguts de metalls dels sòls analitzats en aquest treball.

Amendment of soils with composted sewage sludge. Long term effects on C and N transformation

Jordi Sierra, Neus Roig, Esther Martí, Martí Nadal, Marta Schuhmacher

Publicat al llibre Soil Enzimology in the Recycling of Organic Wastes and Environmental Restoration, Environmental Science and Engineering (2012) 271-282

ABSTRACT

This work aims to evaluate the effects of the current common agricultural use of composted sewage sludge on 5 crop soils, focusing on some chemical, biochemical and ecotoxicological properties related to organic matter mineralization and microbial activity. Therefore, pH, EC₂₅, oxydizable and dissolved carbon, total Kjeldahl N, soluble phenolic compounds, specific UV-absorbance₂₅₄, ammonium and nitrates, dehydrogenase and urease activity have been determined. Soil microbial activity has been assessed by respirometry (cumulative, basal and substrate induced respiration, respiratory activation quotient) and by potential nitrification, according to OECD guidelines. The analyses have been done after a minimum of 6 months since sludge amendment to avoid the initial enhancement due to recent organic matter supply.

The sludge compost enhances some soil properties, as soluble organic matter, carbon mineralization, with general increases in the microbial activity and the active biomass and decreases in the respiratory activation quotients in most soils.

Nitrogen mineralization has been negatively affected in some cases; nitrification and urease activity have decreased in two soils, probably due to the repeated application of sludge, more than to the total amount used. Dehydrogenase activity results are variable. In the poorer native soils it has increased, negatively correlated with the estimated active biomass and positively correlated with the respiratory activation quotient. Little controlled and repeated compost amending could be the cause of a C and N cycles imbalance, producing a decrease of the C/N ratio that can involve risk for waters due to an excess of mineral nitrogen.

1. Introduction

The use of sewage sludge in agriculture is increasing. About 2.7 million tonnes of dry matter, representing about 38% of total sludge production in the EU, are used yearly in agriculture (E. C., 2001). Regulations made on this topic have been taking into account heavy metal concentrations for sewage sludge as well as for soil, and maximum annual heavy metals loads through the application of sewage sludge. However, in the established environmental policies other important issues have not been considered till now. For instance, persistent organic pollutants concentration and the global toxicity of the sludge due to the pollutants load. In fact, many groups of chemicals can interact and have a notable influence on soil functioning and biodiversity (Ros et al., 2006; Schowanek et al., 2004), not only the heavy metal pollution.

Sewage sludge is constituted mainly by organic matter, macro and micronutrients, micropollutants and micro and mesofauna. Sludge amendments improve soil properties such as organic matter, nutrient contents, soil porosity, bulk density, aggregate stability and water holding capacity (Singh and Agrawal, 2008). Sludge materials, as organic amendments, cause initial enhancement in the soil microbial activity and biomass as well as soil biochemical activity, due to higher organic matter and nutrients availability (Marschner et al., 2003).

Among the main soil functions involving soil microorganisms, C and N cycles deserve special attention, as its performance contributes to a good ecological equilibrium (Ros et al., 2006). Also, plant growth is often limited by nutrients, especially N, and water supply. The purpose of this work is to characterize several soil properties (pH, EC₂₅, oxydizable and dissolved carbon, total Kjeldahl nitrogen, soluble phenolic compounds, ammonium and nitrate, specific UV-absorbance₂₅₄, dehydrogenase and urease activities) of 5 soils that have been amended with sewage sludge. Moreover, the effects of the soil sludge amendment on the carbon mineralization process assessed by respirometry (basal and substrate induced respiration), have been determined, as well as the effects of the soil sludge amendment on the nitrogen cycle by potential nitrification and urease activity.

2. Materials and Methods

Soil samples (A, B, C, D, E) have been taken from five plots of agricultural exploitations from Montroig del Camp, Tarragona, Spain. The studied soils correspond to olive and carob crops that had been receiving composted sludges as a current practice. Soils A, B, C and D have been developed on calcareous materials, Soil E is developed on granodiorite and alkaline granite materials. The sampling of the amended soils (indicated by AM in the sample references) has been done at least 6 months after the sludge application, during the summer dry period, except for two plots in which the amendment was done 18 months before. Control soil samples (indicated by CT in the samples reference) have also been taken, from nearby areas with the same soil without sludge application. In some plots the incorporation of sludge in the soil matrix or in surface was not homogeneous. This has been taken into account in the sampling protocol by taking regular grid subsamples from each plot and analyzing them separately. The details regarding plots amendment, annual amount of waste used, number of applications, time elapsed since the last application, and homogeneity is shown in table 1. The control soil for samples A and B is the same one. Samples A-AM and B-AM correspond to the same original soil with different application and tillage operation types. The reference for this control soil is AB-CT. For the rest of controls the references are C-CT, D-CT and E-CT.

Table 1. Soil amendment details

Soil sample	Sludge dose Mg ha⁻¹·year⁻¹	Number of amendments	Last amendment before sampling	Soil tilling	Sludge homogeneity
A-AM	50	1	1.5 years	No	Irregular/non-incorporated
B-AM	80	2	1.5 years	Yes	Regular/ well incorporated
C-AM	30	5	0.5 years	Yes	Irregular/ incorporated
D-AM	60	2	0.5 years	Yes	Regular/well incorporated
E-AM	40	6	0.5 years	No	Irregular/non-incorporated

The residual material used to amend the soils was a composted sludge, coming from the wastewater treatment plant of Vila-seca (Tarragona). Its main properties are shown in table 2. All heavy metal concentrations and organic pollutants quantified are well below the limit values established in the Spanish regulations and in the 3rd draft of the working

document on sludge of the corresponding EC Directive. In soil E only the two last amendments were done with this material. The first four applications were done with non-composted sludge. Regarding ecotoxicological parameters, this compost can be classified as non-phytotoxic (Zucconi et al., 1981) and has low toxicity to bacteria.

The following parameters have been determined in the amended and control soil samples: electrical conductivity and pH in 1:2.5 water extracts, pH in 1:2.5 (w/v) 1N KCl; oxydizable carbon, according to Walkley-Black method (Page et al., 1982); Dissolved Organic Carbon (TOC determination by AJ analyzer Multi N/C 3100 after inorganic carbon elimination), specific UV absorbance (254 nm), and phenolic compounds concentration (Folin-Ciocalteu method, Box, 1983) in 1:5 (w/v) 0.01N CaCl₂ extracts; total Kjeldahl nitrogen; ammonium and nitrate in 1:10 1N KCl; urease activity (Kandeler and Gerber, 1988), dehydrogenase activity (García et al., 2003). Also, the soils basal respiration has been measured as follows: after a pre-incubation at the field soil humidity, samples were incubated in closed reactors with the water content at 60% of the soil water holding capacity, a temperature of 30°C, and darkness throughout the incubation.

The microbial activity was analyzed incubating soil samples (25 g) in manometric respirometers, which allow the determination of sample oxygen consumption (Oxitop®, WTW). The humidity was adjusted to the 60% of the respective soil water holding capacity. Samples were kept at 25°C for 21 days in darkness in a temperature controlled incubator. The cumulative oxygen consumption (Cumulative Respiration, CR) was periodically registered throughout the incubation period. Once the incubation was completed, Substrate Induced Respiration (SIR) was determined, by the quantification of the average oxygen consumed shortly after a substrate addition, when the respiration is fairly constant (12 hours) after substrate addition (aqueous solution equivalent to 4,000 mg glucose per kg of soil) to the incubated samples (OECD, 2000b; ISO, 2002).

Table 2. Main properties of the composted sludge used.

Physico-chemical parameters	
Dry matter	80.3%
pH	7.19
Electrical Conductivity (1:5)	11.61 dS/m
Chemical parameters	
Total-N	3.41 % dm
NH ₄ ⁺ -N	1.35 % dm
Organic-N	2.06 % dm
P (P ₂ O ₅)	6.39 % dm
K (K ₂ O)	0.62 % dm
Organic matter characterization	
Organic matter	50.8 % dm
Resistant organic matter	26.0 % dm
Stability degree	51.2 % dm
Non-hydrolysable N	1.67% dm
C/N ratio	7.2
Soluble phenol compounds	209 mg/kg dm
Potentially toxic elements	
Cr	82 mg/kg dm
Ni	32 mg/kg dm
Pb	89 mg/kg dm
Cu	438 mg/kg dm
Zn	1,068 mg/kg dm
Hg	2.0 mg/kg dm
Cd	1.4 mg/kg dm
Organic pollutants	
AOX	360 mg/kg dm
LAS	1,245 mg LSS/kg dm
Nonylphenols	42.92 mg/kg dm
PAHs	0.88 mg/kg dm
PCBs	0.12 mg/kg dm
Toxic Equivalents dioxin-like PCBs	653.2 ng/kg dm
Ecotoxicological parameters	
Germination Index (1:5 aq. extract) <i>Allium cepa</i>	88.9%
Germination Index (1:5 aq. extract) <i>Lolium perenne</i>	81.1%
(Microtox [®]) EC ₅₀ (1:5 aq. extract) extract	270 mg sludge
(Microtox [®]) EC ₅₀ (acetone/hexane-DMSO extract)	16.1 mg sludge

Basal Respiration rate (BR) was estimated as the average hourly respiration rate over the last 5 days of incubation when the respiration was stable (ISO 2002). The Respiratory Activation Quotient (Q_R) was calculated by dividing the BR rate by the SIR rate according to ISO 17155 (ISO, 2002). All experiments were done in triplicate. Nitrogen transformation test (OECD 2000a) was performed according to OECD 216

guideline, keeping the same incubation conditions as in the respirometric experiment during 4 weeks.

To determine the statistical significance of the differences between amended soils and controls, an ANOVA followed by Duncan's *post-hoc* test ($p < 0.05$) was done with the results of the experiments. Pearson correlations between parameters have been done ($p < 0.01$; or $p < 0.05$) in order to see relationships between the different parameters measured.

3. Results and discussion

The results of the soil parameters quantification are shown in Table 3. According to the parent materials, soil AB-CT, C-CT and D-CT have alkaline pH and fine texture. Soil E-CT has neutral-slightly acidic pH and its texture is coarser than in the other soils. All the control soils have low salinity and organic matter content, and suitable C/N ratios.

In the soils, the composted waste application produces a general effect of compensation of the pH values. The salinity increases with the application of the waste, but the increases never reach values that could be hazardous for the vegetal development or other soil functions as microbial activity and organic matter mineralization.

Though the sampling was done at least 6 months after the last composted sludge application most soils show an increase in the organic matter concentration, and especially in total N, and ammonium and nitrate, compared to the respective controls. There is a consequent decrease in the C/N ratios of the soils, reaching quite low values. There is an increase in soil organic carbon, expectable after the addition of an organic material agreeing with other studies (Marschner et al., 2003).

Table 3. Results of pH, Electrical Conductivity (EC), Oxydizable Carbon (OC), Total Kjeldahl Nitrogen (TKN), Ammonium, Dissolved Organic Carbon (DOC), Specific UV Absorbance 254 nm (SUVA) and soluble phenolic compounds concentration in control and amended soils.

	AB-CT	A-AM	B-AM	C-CT	C-AM	D-CT	D-AM	E-CT	E-AM
pH H₂O	7.80	7.73	7.68	7.87	7.65	8.00	7.78	6.94	7.25
pH KCl	7.45	7.49	7.36	7.58	7.35	7.35	7.66	6.37	6.65
EC₂₅ (μS cm⁻¹)	98.7	236.0*	190.0*	128.3	288.0*	217.0	272.0*	46.1	89.8
Carbonates	++	++	++	++	++	+++	+++	-	-
OC (%)	1.59	1.96*	2.60*	1.89	2.58*	0.88	1.79*	0.61	1.38*
TKN (%)	0.159	0.204*	0.372*	0.19	0.389*	0.07	0.230*	0.057	0.158*
C/N	10.0	9.6	7.0*	9.9	6.6*	12.1	7.8*	10.6	8.8*
NH₄⁺-N (mg kg⁻¹)	2.7	11.0*	8.0*	8.3	9.6	3.2	9.5*	2.8	11.1*
NO₃⁻-N (mg kg⁻¹)	7.3	16.5*	22.1*	9.7	39.5*	6.1	34.4*	8.7	21.7*
DOC (mgC kg⁻¹)	92.8	87.0	186.7*	79.8	310.8*	31.6	160.6*	35.9	125.9*
SUVA (Lmg⁻¹C m⁻¹)	0.93	2.65*	4.19*	3.24	4.16*	0.86	3.86*	3.34	4.21*
Phenols (mg kg⁻¹)	1.1	2.2	7.5*	3.6	11.8*	3.3	10.7*	1.8	7.2*

Field semiquantitative determination of carbonates: ++: 10-20%; +++20-30 % carbonates; -: below detection limit. Mean values. *significant differences between amended and control samples (p<0.05)

The soluble organic matter notably increases in the soils that have been amended with the compost, in any dose and management type. It presents high degree of aromaticity, as it can be deduced from SUVA results. The aromaticity of the organic matter increases with its maturity degree (Stevenson, 1982; Surampalli and Tyagi, 2004). The SUVA values have been used to denote the quality of the dissolved organic matter (Jaffrain et al., 2007), so it seems that the contribution with the composted sludge may enhance the quality of this property. However, the differences between amended samples and controls depend on the original soil and type of management. The aromaticity of the organic matter improves the soil ability to adsorb organic pollutants (de Paolis and Kukkonen, 1997), this is especially important in soils subjected to anthropic influences. Among the aromatic constituents, free phenolic compounds are of special interest. They undergo considerable increases in the amended soils compared to controls. Whereas aromaticity increases with the maturity of organic matter, free phenolic molecules allow some reactivity of this soil component. This is important for soil pollution compensation. However, these compounds may have a notable degree of toxicity, being antimicrobial molecules. In the compost sample the levels of nonylphenols and AOX are notable, though just below the regulation limits. It is important, so, to take into account not only inorganic elements as sludge born pollutants but also organic molecules, and the ability of the soils to compensate this type of pollution.

Total Nitrogen increases in all samples due to the application of composted sludge, parallel to the organic matter inputs. This effect can be seen even much time after the application. In fact, the purpose of adding such materials to soils is to enhance their fertility, regarding organic matter and nutrients. As a consequence of nitrogen inputs, the C/N ratios decrease comparing to control, reaching in some cases excessively low values, as in samples B-AM, C-AM and D-AM. Comparing to the sludge and original soils, the C/N ratios get even lower than what could be foreseen. Generally speaking, nitrogen concentrations are still higher in the samples in which the application of waste is more recent. The decreases in the C/N ratios are usually due to excessive doses or frequency of the amendments. The lowest suitable C/N ratio varies depending on the authors, but it is usually established about 8 or 9 (Gagnard et al., 1988; Saña et al., 1995). From an environmental point of view, the decrease of C/N ratios represents a strong hazard for the water environment, due to the diffuse pollution by mineral nitrogen. For example, the amended soils in this work may have an average excess of 4,000 kg N ha⁻¹ compared to the controls.

Table 4. Cumulative respiration (CR), basal respiration (BR), substrate induced respiration (SIR) and respiratory activation quotient (Q_R) of control and amended soils and the percentage of variation related to control samples.

Soil sample	CR 21 days	% to control	BR	% to control	SIR	% to control	Q _R	% to control
AB-CT	98.2	-	1.30	-	7.40	-	0.186	-
A-AM	107.0	+9.0	1.55*	+19.2	7.13	-3.8	0.217	+16.6
B-AM	149.0*	+51.7	2.51*	+93.0	29.04*	+392.4	0.086	-53.5
C-CT	191.8	-	2.30	-	26.83	-	0.086	-
C-AM	192.5	+0.3	2.64	+14.7	36.49*	+36.0	0.072	-16.3
D-CT	85.4	-	1.43	-	6.05	-	0.236	-
D-AM	193.7*	+126.8	2.27*	+58.8	10.85*	+79.3	0.209	-11.4
E-CT	39.9	-	0.34	-	18.83	-	0.018	-
E-AM	101.4*	+154.1	1.25*	+267.6	35.83*	+90.3	0.034	+88.9

*significant differences between amended and control samples (p<0.05). Units: CR in (mg O₂ 100g⁻¹); BR in mg O₂ kg⁻¹ h⁻¹; SIR in mg O₂ kg⁻¹ h⁻¹.

Ammonium and nitrate concentrations also tend to increase in the amended soils, due to the long term mineralization of the waste organic nitrogen. Also, negative correlations have been found between C/N ratios and soluble mineral nitrogen forms, with correlation coefficients of 0.448 and 0.509 (p<0.05). The mobilization of mineral nitrogen after organic matter decomposition may enhance vegetal nutrition, but also negative consequences on water pollution due to mineral nitrogen leaching have to be taken into account. This should be especially important in the E soil, because of its “a

priori” lower exchange capacity, and coarse texture, which makes it more susceptible to nitrogen losses.

Regarding the microbial activity (table 4), the CR increases in all samples; this parameter shows the overall soil state (microbiota and nutrient availability). Organic matter addition often leads to a rapid increase of soil respiration, linked with the availability of organic matter (Marschner et al., 2003). In the case of the soils with the lowest organic matter concentration (D, E) the increases are above 100%. These two samples correspond to the soils with the highest initial C/N ratio. The BR increases in all the amended soils. It represents the real biological activity, considered when the labile carbon source is exhausted and the respiratory activity is stabilized. This increase in the activity is parallel to an increase in SIR values. This later parameter represents the active biomass (ISO, 2002). In this work, CR and BR are positively correlated to DOC (0.578 and 0.566, $p < 0.01$) and oxydizable carbon (0.750 and 0.694 $p < 0.01$), which are brought with the sludge amendment. The microbial respiration activity is affected by several parameters, as water content, temperature, the quality of the soil organic matter, contaminants, i.e. (Eisentraeger et al., 2005). SIR values, which are sensitive indicators of toxicity in soils (Martí et al., 2007), are also higher in the amended samples, so no toxicity can be found in the amended soils, even considering the pollutants load and the time elapsed since the application, which might allow the exhibition of long term effects after initial enhancement due to the organic matter increase (Montserrat et al., 2006). Usually, in the presence of toxicants, the initial increases of CR are due to the consumption of labile organic matter from the dead organisms and/or the presence of organic matter in the waste, in this case, the toxicity may be revealed by a decrease in SIR values. The Q_R measures the relationship of the activity of microbiota and the number of active microorganisms, serving as an indicator of stress of soil microbiota, Q_R values above 0.3 may indicate soil microbiota stress in polluted soils (ISO, 2002). However, increased Q_{RS} may occur for two reasons. On one hand, they are an indicator of bioavailable carbon sources. On the other hand, increased Q_{RS} may indicate the presence of contaminants that are not biodegradable, e.g., heavy metals (Eisentraeger, et al., 2005). In this work the estimated values of Q_R are below this limit, the application of waste generally decreases the Q_R , and so the stress level, except for the acidic soil, which show significant increase of about a 90%, this is the less active native soil, has lower pH and coarse texture, and low exchange capacity. It has received high amounts

of waste and not all the sludge received was previously stabilized by composting processes.

Nitrogen transformation assay results are shown in figure 1. The amendment of AB-CT with composted sludge produces an increase in the potential nitrogen mineralization. In soils C, D and E nitrogen mineralization tends to decrease due to the compost application, being significant in the last two samples. The inhibitory effect is produced in the amended soils coming from native soils with poorest biological activity (D and E).

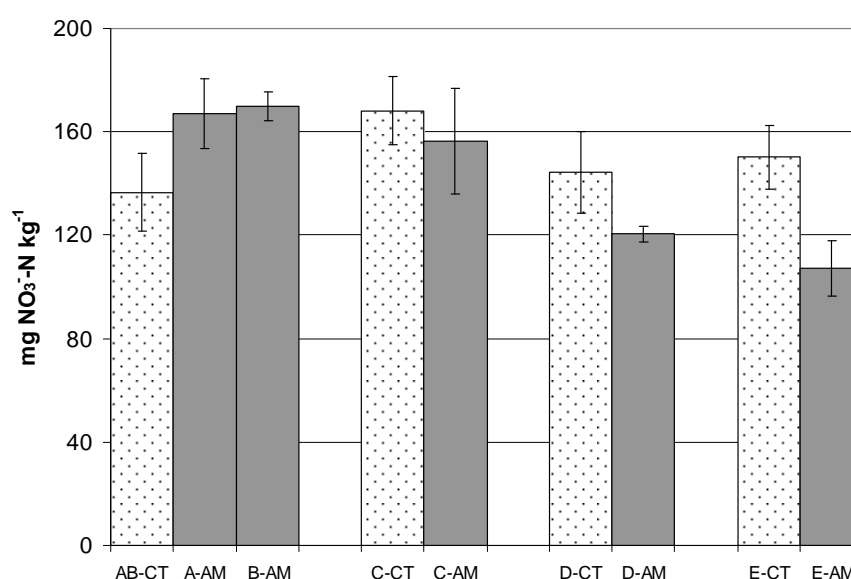


Figure 1. Nitrogen transformation test. Total nitrates released during the incubation period.

Urease (UA) and dehydrogenase activity (DHA) results are shown in figure 2. UA values are similar to those of N mineralization. So, it seems that this may be one of the limiting steps in the nitrogen mineralization process. The decrease in the UA compared to the control soils seems to be depending on the time elapsed since the last waste application and on the frequency of application more than on the dose applied. We have found negative correlations between the differences in UA of amended and control samples and the frequency of applications (-0.545; $p < 0.01$). Some authors report that UA decrease in soils where repeated applications of ammonium are produced, related with the by-products of the microbial assimilation of inorganic forms of nitrogen (McCarty et al., 1992). Soils C and E (with significant inhibition in UA) have received 5 and 6 applications of compost, respectively. The effects on UA due to a recent use of

wastes might be related to the inhibition caused by the release of pollutants during the sludge mineralization (Kizilkaya and Bayrakli, 2005). UA has been reported as a sensitive parameter for metal pollution toxicity (García et al., 2003). However, some authors have reported increases in the UA related to the increase of toxic metals (Moreno et al., 1999). This enzymatic activity is not affected by microbial biomass (García et al., 2003), and this has also been observed in this work, as no significant correlations have been found between this parameter and those corresponding to the microbial activity or biomass.

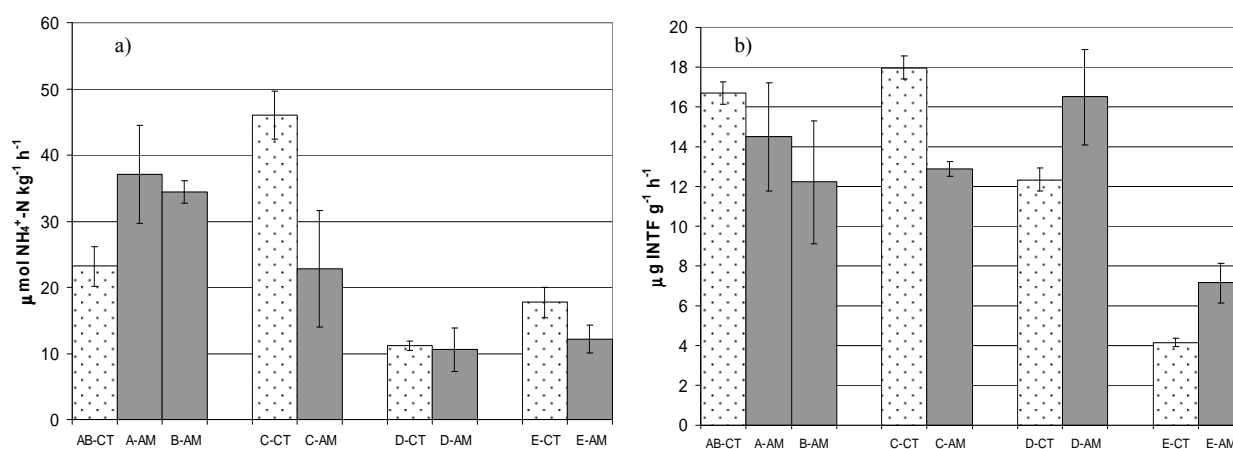


Figure 2. Urease activity (UA) (a) and dehydrogenase activity (DHA) (b) of samples.

Dehydrogenase is an intracellular enzyme involved in microbial O_2 metabolism. This activity depends on the metabolic state of the soil biota and may be a good indicator of soil microbial activity in semiarid areas (García et al. 1994). The amendment with composted sludge produces different effects (increase or inhibition) in DHA, depending on the soils tested. DHA has been most related to an enhancement in the microbial processes and biomass, and to increases in the organic matter concentration in soils (García et al., 2003). The effect of sludges on soil DHA is not always consistent among different studies. Metal polluted sludges may increase or decrease DHA. It is important to note that DHA activity is enhanced if the rate of sewage sludge addition to soil is limited, as high doses of amendment may reverse the DHA effect. However, the microbial activity is usually stimulated by sludge applications, even in the presence of metals over controlled concentrations (Obbard et al., 1994; Reddy and Faza, 1989). The results in this work show some inhibitions in samples that have shown general increases in the microbial activity, and increases in other samples. No significant correlations

have been found between DHA and most parameters, except for two of them, SIR and Q_R , with correlation coefficients of -0.398 and 0.408, respectively ($p < 0.05$). So, the DHA increases seem to be related, in this case, to “stress parameters”, as SIR values decrease in the presence of toxicants, and Q_R increases in the same situation (ISO, 2002).

4. Conclusions

The application of compost on soils, as it is known, enhances some soil properties. Increases of soluble organic matter concentrations, together with its aromaticity and phenolic compounds content, have been found.

Carbon mineralization seems to be enhanced due to the sludge compost application. This can be observed as general increases in the microbial activity and the active biomass and decreases in the respiratory activation quotients except for one of the soil samples. This indicates little negative effects on the aerobic heterotrophic microbiota, even if long time has elapsed since the last sludge application and an eventual toxicity effect could be revealed due to the accumulation of pollutants.

On the other side nitrogen mineralization processes have been more negatively affected than carbon transformations. Nitrification and urease activity have decreased in two of the soils. This is probably due to the repeated application of sludge, more than to the total amount used. Dehydrogenase activity results are variable in the different soils assayed. In the poorest native soils this enzymatic activity has increased, negatively correlated with the estimated active biomass and positively correlated with the respiratory activation quotient. Such effects can be related to a certain degree of stress in the soils, so further research should be done on this issue.

The repeated and not sufficiently controlled (high doses also) compost amending could be the cause of the imbalance between C and N cycles producing a decrease of the C/N ratio that can involve significant risk of water contamination by excess of mineral nitrogen.

Acknowledgements

This work is supported by the project CTM2007-64490-TECNO Ministry of Education and Science of Spain and the SOSTAQUA project, founded by CDTI in the framework of the Ingenio 2010 Program under the CENIT call.

References

- Box, J.D., 1983. Investigation of the Folin-Ciocalteu phenol reagent for the determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Research* 17, 511-525.
- De Paolis F., Kukkonen, J., 1997. Binding of organic pollutants to humic and fulvic acids: influence of pH and the structure of humic material, *Chemosphere*, 34, 1693–1704.
- E. C. (European Commission), 2001. Disposal and Recycling Routes for Sewage Sludge. Scientific and technical sub-component report. DG Environment-B/2. Luxembourg. European Communities.
- Eisentraeger, A., Hund-Rinke K., Roembke J., 2005. Assessment of Ecotoxicity of Contaminated Soil Using Bioassays. In: Margesin, R, Schinner, F. (Eds). *Manual for Soil Analysis - Monitoring and Assessing Soil Bioremediation*. Book Series: Soil Biology, Volume 5. Springer Berlin Heidelberg.
- Gagnard, J., Huguet, C., Ryser, J.P., 1988. L'analyse du sol et du végétal dans la conduite de la fertilisation : le contrôle de la qualité des fruits. *Organisation Internationale de la Lutte Biologique et Intégrée*.
- García, C, Gil., F., Hernández, M.T., Trasar, C. (Eds.), 2003. *Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medidas de actividades enzimáticas y biomasa microbiana*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- García, C., Hernández, T., Costa F., 1994. Microbial activity in soils under Mediterranean environmental conditions. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, 457-466.
- ISO, 2002. Soil quality. Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves. Reference number ISO 17155:2002 (E). Switzerland
- Jaffrain, J., Gérard, F., Meyer, M, Ranger, J., 2007. Assessing the quality of dissolved organic matter in forest soils using Ultraviolet Absorption Spectrophotometry. *Soil Science Society of America Journal*, 71, 1851-1858.
- Kandeler, E., Gerber, H., 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils* 6, 68-72.
- Kizilkaya R., Bayrakli, B., 2005. Effects of N-enriched sewage sludge on soil enzyme activities. *Applied soil ecology* 30, 3, 192.
- Marschner, P., Kandeler, E., Marschner, B., 2003. Structure and function of the soil microbial community in a long-term fertilizer experiment . *Soil Biology & Biochemistry* 35 453–461.
- Martí, E.; Sánchez, M.; Sierra, J.; Cruañas, R.; Garau, M.A., 2007. Ecotoxicological tests assessment of soils polluted by Chromium (VI) and Pentachlorophenol. *Science of the Total Environment*, 378, 53-57.
- Mc Carty, G.W., Shogren, D.R., Bremner, J.M., 1992. Regulation of urease production in soil by microbial assimilation of nitrogen. *Biology and Fertility of Soils* 12, 261-264.

- Montserrat, G., Martí, M., Sierra, J., Garau, M.A., Cruañas, R., 2006. Discriminating inhibitory from enhancing effects in respirometry assays from metal polluted-sewage sludge amended soils. *Applied Soil Ecology*, 34, 52-61
- Obbard J.P., Sauerbeck, D., Jones, K.C., 1994. Dehydrogenase activity of the microbial biomass in soils from a field experiment amended with metal contaminated sewage sludges *The Science of the Total Environment*, 142 , 157-162
- OECD, 2000a. OECD Guidelines for the testing of chemicals. 216. Soil Microorganisms: Nitrogen transformation test.
- OECD, 2000b. OECD Guidelines for the testing of chemicals. 217. Soil Microorganisms: Carbon transformation test.
- Page, A.L., Miller, R.H., Kenney, D.R., 1982. *Methods of Soils Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2nd Ed. Agronomy series n. 9. ASA. SSSA. Madison, Wisconsin. USA.
- Reddy, G.B., Faza, A., 1989. Dehydrogenase activity in sludge amended soil. *Soil biology and biochemistry* 21, 2, 327.
- Ros, M., Pascual, J.A., García, C., Hernández, M.T. Insam, H., 2006. Hydrolase activities, microbial biomass and bacterial community in a soil after long-term amendment with different composts. *Soil Biology & Biochemistry* 38, 3443–3452.
- Saña, J., Moré, J.C., Cohí, A., 1996. *La gestión de la fertilidad de los suelos*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Schowaneck, D., Carr, R., David, H., Douben, P., Hall, J., Kirchmann, H., Patria, L., Segui, P., Smith, S., Webb, S., 2004. A risk-based methodology for deriving quality standards for organic contaminants in sewage sludge for use in agriculture—Conceptual Framework. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 40, 227–251
- Singh, R.P., Agrawal, M., 2008. Potential benefits and risks of land application of sewage sludge. *Waste Management*, 28, 347-358.
- Stevenson, F.J., 1982. *Humus chemistry. Genesis, composition, reactions*. New York, John Wiley & sons.
- Surampalli, R.K., Tyagi, K.D., 2004. *Advances in water and wastewater treatment*. American Society of Civil Engineering. USA . 529.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, H., de Bertoli, M., 1981, Evaluating toxicity of immature compost. *Biocycle* 22, 54-57.

DISCUSSIÓ DEL CAPÍTOL IV

En aquest capítol, s'han estudiat els efectes de l'aplicació de residus procedents d'estacions depuradores d'aigües urbanes, llots i fangs compostats, a la matriu sòl (sòls agrícoles). En el capítol anterior, es feia referència a la càrrega contaminant que duen associats aquests subproductes i a l'ecotoxicitat i fitotoxicitat, que fonamentalment estan condicionades pel grau d'estabilització de la matèria orgànica d'aquests. És ben conegut l'efecte beneficiós que té l'aplicació de fangs i/o compost al sòl a curt termini, però hi ha pocs treballs que n'estudiïn els efectes a llarg termini, és a dir, quan el fang ja s'ha mineralitzat o incorporat completament a la matriu del sòl i els contaminants d'aquest s'han pogut alliberar.

El present treball descriu dos casos d'estudi. En el primer, s'ha estudiat com afecta l'aportació repetitiva i a dosis controlades de fang a sòls agrícoles (cereal). En el segon, s'han establert els efectes de l'aportació convencional, és a dir de forma i a dosis poc controlades de fangs compostats (i en algun cas sense compostar), també sobre sòls agrícoles (olivera i garrofer). S'ha de tenir en compte que l'aplicació de fangs o compost de manera convencional (fet comú en les pràctiques agrícoles actuals) generalment implica també l'aportació d'altres esmenes fertilitzants, fet que sovint pot dificultar la interpretació dels resultats.

Per tal de valorar els efectes sobre la matriu sòl, s'han efectuat diversos anàlisis. Per una banda s'ha estudiat la fertilitat del sòl, i per l'altra, l'acumulació de contaminants i els seus efectes com ara paràmetres referents al funcionament del sòl i a l'ecotoxicitat. Concretament, s'han aplicat tests per avaluar l'estat i funcionament dels microorganismes implicats en la mineralització del carboni i el nitrogen i algunes activitats enzimàtiques (deshidrogenasa i ureasa). També s'ha valorat la fitotoxicitat amb les espècies *R. sativus* i *A. cepa* i l'ecotoxicitat mitjançant *V. fischeri*.

Els resultats comparatius dels dos estudis han indicat que l'aportació reiterada de fangs i fangs compostats sobre sòls calcaris pot donar lloc a l'acidificació del complex de canvi. No obstant, no afecta al pH actual del sòl gràcies al poder tampó dels carbonats del sòl (en el cas dels sòls calcaris). En ambdós casos, hi ha hagut increments en el contingut de matèria orgànica del sòl, l'aromaticitat del carboni dissolt i de nitrogen,

així com les formes mòbils d'aquest. També s'observà un increment en el contingut de fenols solubles del sòl (sobretot en aplicacions poc controlades), fet que es podria relacionar amb els fenols lliures que aporta el fang (veure capítol III). A aquests compostos, se'ls atribueixen propietats antimicrobianes i fitotòxiques, però pel fet de tenir valors baixos de K_{ow} i ser molt solubles (per tant mòbils), tendeixen a ser degradats i/o incorporats a la matèria orgànica del sòl (Sierra et al., 2007). Pel que fa a l'acumulació d'elements potencialment tòxics, s'observa que els sòls esmenats acumulen significativament Hg, Mo, Zn, Cu, Cr i Pb, però a concentracions per sota dels Nivells Genèrics de Referència establerts per l'Agència de Residus de Catalunya (ARC), exceptuant alguns casos on l'aplicació de llocs es fa de manera convencional, pel Cu i Zn (Annex II).

En referència als efectes sobre el **funcionament del sòl**, els microorganismes responsables del cicle del carboni (paràmetres: respiració basal i quocient d'activació respiratòria) no han presentat efectes negatius significatius fruit de l'aplicació reiterada de fangs i fangs compostats. En general, la biomassa potencial activa (respiració induïda per substrat) s'ha incrementat respecte als sòls control i el quocient d'activació respiratòria (indicador d'estress si augmenta) ha tendit a mantenir-se o baixar, exceptuant el cas de l'únic sòl àcid que s'ha analitzat.

Pel que fa l'estudi de la **mineralització del nitrogen**, l'aplicació de dosis de fang de forma repetitiva i incontrolada sobre sòls amb baixa activitat biològica (més sensibles) origina efectes inhibidors sobre la nitrificació i l'activitat enzimàtica ureasa (també implicada en el cicle del N). Això provoca un desequilibri en els cicles del C i N que acaba provocant una baixada de la relació C/N del sòl, i alhora pot comportar problemes de contaminació d'aigües degut a la mobilització de nitrats (Gagnard et al., 1988; Saña et al., 1996). L'activitat ureasa és un paràmetre molt sensible a la toxicitat per metalls. L'afectació d'aquesta activitat enzimàtica observada en aplicar els fangs de forma convencional, pot deure's a l'efecte tòxic dels metalls que es van alliberant a mesura que el fang o compost es va mineralitzant en el sòl. Com s'ha comentat anteriorment, l'aplicació poc controlada de fangs pot causar l'acumulació d'alguns metalls, no observable quan l'aplicació del fang es fa de forma ben planificada.

Respecte a la **fitotoxicitat**, *A. cepa* ha resultat ser una espècie prou sensible per detectar fitotoxicitat en sòls. L'efecte fitotòxic sembla estar relacionat amb el nombre d'aplicacions i la quantitat total de fang aplicat més que amb la dosi, i podria estar relacionat amb l'acumulació de Cd, Hg, Pb, Cr, Cu, Zn o compostos orgànics (entre ells, els fenols).

En extractes aquosos (NaCl 2%) en cap cas s'ha trobat toxicitat mitjançant el test del Microtox[®]. Una possible causa seria que els metalls i contaminants orgànics estan bloquejats al sòl i són poc biodisponibles. També és convenient recordar que es tracta de sòls calcaris, fet que afavoreix el bloqueig dels metalls.

La comparació dels tres estudis confirma que una aplicació controlada i sistemàtica d'aquests residus en sòls agrícoles pot evitar problemes de contaminació de les aigües subterrànies per nitrats, ja que es millora l'eficiència dels processos de mineralització del nitrogen. A més, d'aquest treball es deriva la recomanació que si s'apliquen fangs de depuradora urbana digerits anaeròbiamment a dosis aproximades de 40 Mg ha⁻¹ cada dos anys sobre sòls calcaris i de textura fina, es poden minimitzar els problemes d'acumulació de contaminants, contaminació d'aigües subterrànies i funcionament del reciclatge de la matèria orgànica. A llarg termini, una bona gestió i aplicació d'aquests residus augmenta l'eficiència de reciclatge i allarga el temps d'aplicació als sòls, sense que se'n ressenti el funcionament de la matriu sòl.

CAPÍTOL V. AIRE

Resum de l'Article

Avaluació dels efectes tòxics de mostres d'aire de PM₁₀ mitjançant l'aplicació de diferents tests *in vitro*. Efectes ecotoxicològics, citotòxics i genotòxics

La inhalació de l'aire és una via d'exposició important a contaminants ambientals, com ara metalls pesants, dibenzo-p-dioxines policlorades i dibenzofurans (PCDD/Fs) i material particulat. L'exposició crònica a tots ells, els quals formen part de mescles ambientals complexes de contaminants, representa sovint importants riscos per a la salut humana. En el present estudi s'ha investigat la idoneïtat de diferents tests *in vitro* per tal d'avaluar els efectes tòxics dels contaminants retinguts en les PM₁₀. A més, també s'ha avaluat la contribució dels contaminants químics en la toxicitat. Per a aquest estudi, es recolliren seixanta-tres mostres d'aire en diferents àrees de Catalunya i s'avaluà els nivells d'ecotoxicitat, citotoxicitat i genotoxicitat. Es realitzaren extractes aquosos lleugerament acidificats dels filtres de fibra de vidre (QFF) on es retenen les PM₁₀. Es realitzà el bioassaig amb el fotobacteri *Vibrio fischeri* (Microtox[®]) per tal d'avaluar l'ecotoxicitat de les mostres i a més, es realitzaren els tests *MTT Assay* i *Comet Assay*, ambdós utilitzant cèl·lules epitelials de pulmó humà (línia A549), per avaluar la possible citotoxicitat i genotoxicitat de les mostres, respectivament. Els resultats de l'estudi han demostrat que el test Microtox[®] sembla ser un test excel·lent per a fer una primera avaluació de la qualitat de l'aire ja que ha mostrat bona correlació amb els nivells de contaminants (metalls i PCDD/Fs), a diferència del *MTT Assay*. No obstant, un 20% de les mostres mostraren citotoxicitat. Tot i que cap de les mostres mostrà genotoxicitat, es trobà molt bona correlació entre aquest test *in vitro* i alguns agents carcinògens. Les mostres de zones urbanes impactades pel trànsit foren significativament més tòxiques que les situades en altres zones. Finalment, la temperatura ambiental s'ha identificat com un paràmetre clau, ja que en general els valors més elevats d'ecotoxicitat es trobaren en les mostres recollides a l'hivern.

***In vitro* tests to assess toxic effects of airborne PM₁₀ samples. Correlation with metals and chlorinated dioxins and furans**

Neus Roig, Jordi Sierra, Joaquim Rovira, Marta Schuhmacher, José L. Domingo, Martí Nadal

Accepted at Science of the Total Environment

ABSTRACT

Inhalation is an important exposure pathway to airborne pollutants such as heavy metals, polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs) and particulate matter. Chronic exposure to those chemicals, which form part of complex environmental mixtures, may mean important human health risks. In the present study it is investigated the suitability of different *in vitro* tests to evaluate the toxic effects of air PM₁₀ pollutants. In addition, it is also assessed how to distinguish the contribution of chemical pollutants to toxicity. Sixty-three air samples were collected in various areas of Catalonia (Spain), and the levels of ecotoxicity, cytotoxicity and genotoxicity were evaluated. Aqueous acidic extractions of quartz fiber filters, where PM₁₀ had been retained, were performed. The photo-luminescent bacteria *Vibrio fischeri* (Microtox[®]) bioassay was performed to assess ecotoxicity. Moreover, MTT and Comet Assays, both using human lung epithelial cells A549 as target cells, were applied to assess the cytotoxicity and genotoxicity of air samples, respectively. The results show that Microtox[®] is an excellent screening test to perform a first evaluation of air quality, as it presented a significant correlation with chemical contaminants, contrasting with MTT Assay. Although none of the samples exhibited genotoxicity, a high correlation was found between this *in vitro* test and carcinogenic agents. Urban samples from traffic-impacted areas would be significantly more toxic. Finally, environmental temperature was identified as a key parameter, as higher values of ecotoxicity were found in winter.

1. Introduction

Air particulate matter (PM) is one of the most important environmental problems in densely populated and industrialized areas (Traversi et al., 2011), being also responsible of important adverse effects on human health. Recent epidemiological studies suggest that long-term exposure to air pollution can increase the risk of cardiopulmonary diseases and lung cancer mortality (Gualtieri et al., 2012). Atmospheric PM is made up of a complex mixture of substances with natural and/or anthropogenic origin and different chemical composition (Gualtieri et al., 2009, 2010). According to its aerodynamic diameter, PM is classified as coarse (PM_{10}), fine ($PM_{2.5}$), and ultrafine particles ($PM_{0.1}$) (Gualtieri et al., 2009). The breathable fraction of ambient particulate matter (PM_{10}) is widely used as air quality indicator (EC, 2008; WHO, 2006). Although PM_{10} pollution is particularly related to urban environments (Pelucchi et al., 2009), it is also the result of nucleation and condensation processes in the atmosphere (Pérez et al., 2010). Therefore, the chemical composition of these particles, as well as the associated toxicity, may vary depending on a number of factors (e.g., location characteristics, meteorological parameters, etc.) (Pérez et al., 2008; Traversi et al., 2011). The knowledge of the exposure to inorganic and organic chemicals is crucial for environmental health protection and risk assessment. In recent years, different environment matrices and human tissues have been used for the detection, monitoring and evaluation of the human exposure to environmental pollutants (Covaci et al., 2002; Barbounis et al., 2012). Some inorganic and organic chemicals such as heavy metals and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans (PCDD/Fs), may be sorbed to PM_{10} . Because of their notable toxicity, bioaccumulation capacity and long environmental persistence, these pollutants have raised a notorious public concern (Tsatsakis and Tutudaki, 2004; Rovira et al., 2011c). Among other effects, heavy metals are able to induce oxidative damage in the cardiopulmonary system (Valavanidis et al., 2008), while PCDD/Fs play a role as potential endocrine disruptors (Clemons et al., 1998), being also considered as carcinogens (Rovira et al., 2011c).

In recent years, the interest of performing ecotoxicological studies to evaluate the ecological effects of human impacts has considerably increased (Zhao et al., 2009; Yamamoto et al., 2011; Roig et al., 2012). Ecotoxicity tests have been applied to a number of environmental compartments, being soil and water the most predominant (Roig et al., 2011). Nowadays, very few studies exist on the ecotoxicity assessment of PM_{10} . However, some authors support the use of standardized ecotoxicity tests as a first screening to examine the

toxicity of airborne particulate matter (Evagelopoulos et al., 2009; Kováts et al., 2012; Triolo et al., 2008; Vouitsis et al., 2009). The Microtox[®] test is an *in vitro* bioassay aimed at measuring the ability of a toxicant to inhibit the bioluminescence of the bacterium *Vibrio fischeri*. Although it has been widely used for assessing acute toxicity of various contaminants in liquid or solid samples (Roig et al., 2011), this method has not been extensively applied in the air matrix. In a higher biological level of the trophic web, numerous toxicological studies on human health impact assessment have been published. In this framework, cell line A549 has been confirmed as a useful *in vitro* model to study the PM effects on lung cells, as the former exhibits similar characteristics to human alveolar type II cells (Gualtieri et al., 2009; Schilirò et al., 2010). MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) bromide is a well-known standardized method to assess the cytotoxicity of pollutant effects (Leung et al., 2011), evaluating cell viability by an enzymatic reaction. In turn, Comet assay is used to generate data about genotoxicity by measuring DNA strand breakage in single cells (Wang et al., 2011). Both methods are considered sensitive and rapid, being suitable for environmental monitoring (Park and Choi, 2007).

The aim of the present study was to investigate the suitability of different *in vitro* tests to evaluate the toxicity of airborne PM₁₀ extracts. Results were compared with concentrations of heavy metals, PCDD/Fs, and PM₁₀ obtained in 63 locations of Catalonia (NE of Spain). Ecotoxicity, cytotoxicity and genotoxicity of air was evaluated by applying Microtox, MTT and Comet Assays, respectively. The ultimate objective of this investigation was to evaluate the suitability of short-term bioassays using lung human cells or environmental species as appropriate screening methods to complement routine chemical analysis.

2. Materials and methods

2.1. Sampling procedure and chemical analysis

Between 2008 and 2011, sixty three air immission samples were collected in industrial (n=8), urban (n=36) and rural (n=19) locations of Catalonia (NE of Spain) in different seasonal periods (12, 24 and 27 samples in the cold, moderate and warm seasons, respectively). All sampling areas were potentially affected by the presence of industrial sources: a cement plant (n=43), a hazardous waste landfill (n=8), or a municipal solid waste incinerator (n=12). Codification and characteristics of each sample are listed in Supplementary Content (Table S1). PCDD/Fs and metals in air were separately sampled by

means of TE-1000 PUF and TE-6070DV (Tisch Environmental, Cleves, OH) high-volume active sampling devices, respectively. Additional information on sampling is provided in Supplementary Content, as well as in previous publications (Rovira et al., 2010a,b, 2011a,b,c, 2012; Vilavert et al., 2009, 2011). Furthermore, details on pre-treatment and analytical procedure are also available in the Supplementary Content. Briefly, the concentrations of arsenic (As), cadmium (Cd), cobalt (Co), chromium (Cr), copper (Cu), mercury (Hg), manganese (Mn), nickel (Ni), lead (Pb), antimony (Sb), tin (Sn), thallium (Tl), vanadium (V) and zinc (Zn) were determined by inductively coupled plasma spectrometry (ICP-MS, Perkin Elmer Elan 6000), while PM₁₀ was determined by gravimetric analysis. In turn, PCDD/Fs were determined by high resolution gas chromatography coupled to high resolution mass spectrometry (HRGC/HRMS) (Appenzeller and Tsatsakis, 2012). The levels of 17 2,3,7,8-chlorinated PCDD/F congeners were analyzed in each sample, integrated with both gas and particle phases. Finally, the gas-particle partitioning was calculated according to Lee and Jones (Lee and Jones, 1999).

2.2. Toxicity tests

An aqueous extraction of air filters was performed by means of a mild acid microwave digestion (15 mL 0.1M HNO₃ at 2% NaCl) of one eighth of the filter (eighth area: 64.4 cm²) in Teflon bombs, according to the US EPA method 3051A (USEPA, 2007). After microwave digestion, the content was filtered with Whatman[®]-42 filters, being the resulting extract neutralized to pH 7.0 ± 0.2 with 0.5M NaOH. Ecotoxicity of extracts was determined by Microtox[®] bioassay, using the bioluminescent bacteria *Vibrio fischeri* and measuring the inhibition of light emission when organisms were exposed to air extract samples. EC₅₀ value was estimated as the sample concentration causing 50% of light inhibition on the test organisms. A Toxicity Index (TI) of ecotoxicity results was calculated by comparing the EC₅₀ of each sample with the value estimated for a blank filter (Roig et al., 2011, 2012). A positive control of zinc sulphate was included in every run.

Cytotoxicity was evaluated by means of A549 lung carcinoma cell lines (ATCC, CCL-185), which were kept in Dulbecco's Modified Eagle's Medium, supplemented with 10% inactivated Foetal Bovine Serum, 4 mM Glutamine, and 0.5% penicillin/streptomycin in a ThermoForma incubator at 37°C and 5% CO₂. Cells were seeded at a concentration of 1.5 x 10⁵ in 96-well plates and exposed to PM₁₀ extracts at 1% concentration. MTT assay [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] was used to measure cell viability

according to the INVITTOX Protocol N° 17 (INVITTOX, 1990). Briefly, the rationale of this method is based on the capability of the mitochondrial enzyme succinate-DH to hydrolyze the MTT compost (yellow tetrazole) to formazan (blue), allowing the determination of the mitochondrial functionality in exposed cells. The number of live cells is proportional to the amount of formazan, being therefore proportional to color intensity. Sodium Dodecyl Sulphate 0.02% in culture medium was used as positive control, while culture media, NaNO₃ and blanks were negative controls. MTT Assay tests were performed by quadruplicate after 24 h.

In order to evaluate the DNA damage caused by clastogenic agents, strand breaks formation was analyzed by the alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) assay, simply known as Comet Assay. This test was also conducted with the same A549 lung carcinoma cells line as in MTT Assay (ASTM, 2010). Briefly, after DNA treatment of cells exposed to sample extracts, DNA was submitted to an electrophoretic migration, fluorochrome-dyed and observed by fluorescence microscope. Non-damaged genetic materials remained spherically *in situ*, while DNA breakage produced small fragments similar to a comet tail. DNA damage was quantified by the percentage of fluorescence in the tail. Methylmethane sulphonate 400 µM in culture medium was used as positive control while culture media, NaNO₃, and blanks were negative controls. Tests were performed by duplicate after 24 h.

2.3. Statistics

Data analysis was carried out by means of the statistical software package IBM SPSS Statistics Package 19.0. Significant differences were determined by considering a probability lower than 0.05 ($p < 0.05$). The Levene test was firstly applied to evaluate the homogeneity of variances. Furthermore, ANOVA and Tukey tests for parametric parameters, and Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests for non-parametric variables, were executed. Finally, a Spearman correlation analysis between toxicity results and pollutant levels was applied.

3. Results and discussion

Mean levels of PM₁₀ and heavy metals in air samples from Catalonia (Spain) according to the characteristics of the location, the additional pollution emission sources, and the sampling season, are summarized in Table S2 (Supplementary Content). In general terms, airborne levels of those pollutants were in agreement with those previously reported by other

authors (Cavanagh et al., 2009; Schilirò et al., 2010; Toscano et al., 2011). In comparison with legislative requirements, most samples fulfilled the European regulations, with the exception of a few urban and industrial samples, for which PM_{10} and arsenic concentrations slightly exceeded target values established in the EC Directives 2008/50/EC and 2004/107/EC, respectively. However, the levels of the remaining metals were clearly below legislative thresholds. In general terms, air samples from urban zones showed higher metal concentrations as was observed by Toscano et al. (2011). The levels of Cd, Ni, Pb and Zn were significantly higher in urban and industrial areas, in comparison to rural zones. These elements have been associated with traffic-related emissions (Gunawardena et al., 2012; Hengren et al., 2006; Kemp, 2002), as well as re-suspension of metals adsorbed to soil particles (Usman, 2008). Cadmium and Pb levels in areas influenced by a cement plant (CP) or a municipal solid waste incinerator (MSWI) were significantly higher than those registered in the vicinity of a hazardous waste landfill (HWL). It must be highlighted that combustion has been identified as a significant emission source of Cd (Sternbeck et al., 2002). Although metal concentrations seemed to be correlated with environmental temperature, as levels were slightly higher in winter, no significant differences were noted according to the season, being in agreement with the results reported by other authors (Gualtieri et al., 2010).

Mean levels of the 17 2,3,7,8-chlorinated PCDD/F congeners in air samples from diverse areas of Catalonia (Spain) according to the kind of zone, source and season, are summarized in Table S3 (Supplementary Content). Air concentrations of PCDD/Fs in urban areas, and in a lesser extension in industrial zones, were generally higher than those found in rural areas. With the exception of low-substituted furans (2,3,7,8-TCDF, 1,2,3,7,8-PeCDF and 2,3,4,7,8-PeCDF), rural samples showed significantly lower levels than urban and industrial airborne samples.

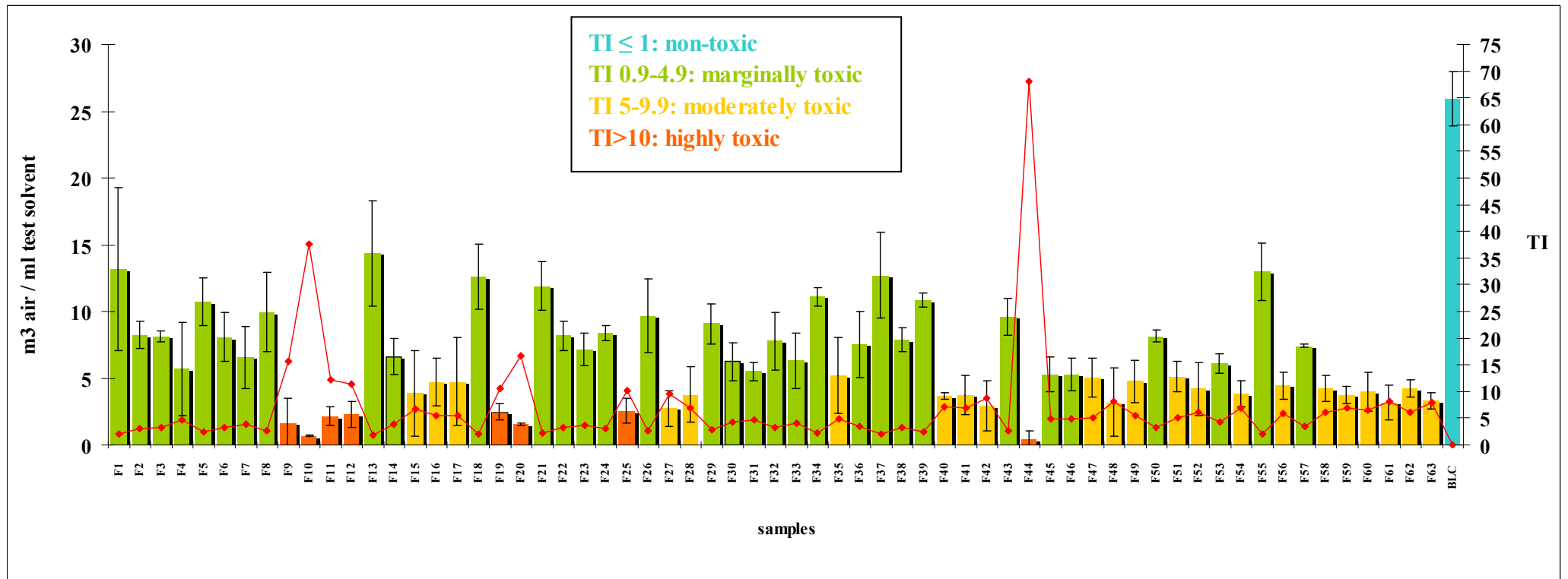


Fig. 1. Microtox[®] results. The columns show EC₅₀, expressed as m³ of air/mL of test solvent (Microtox[®] diluent), while the red line represents the Toxicity Index (TI) values. In blue, blank's EC₅₀.

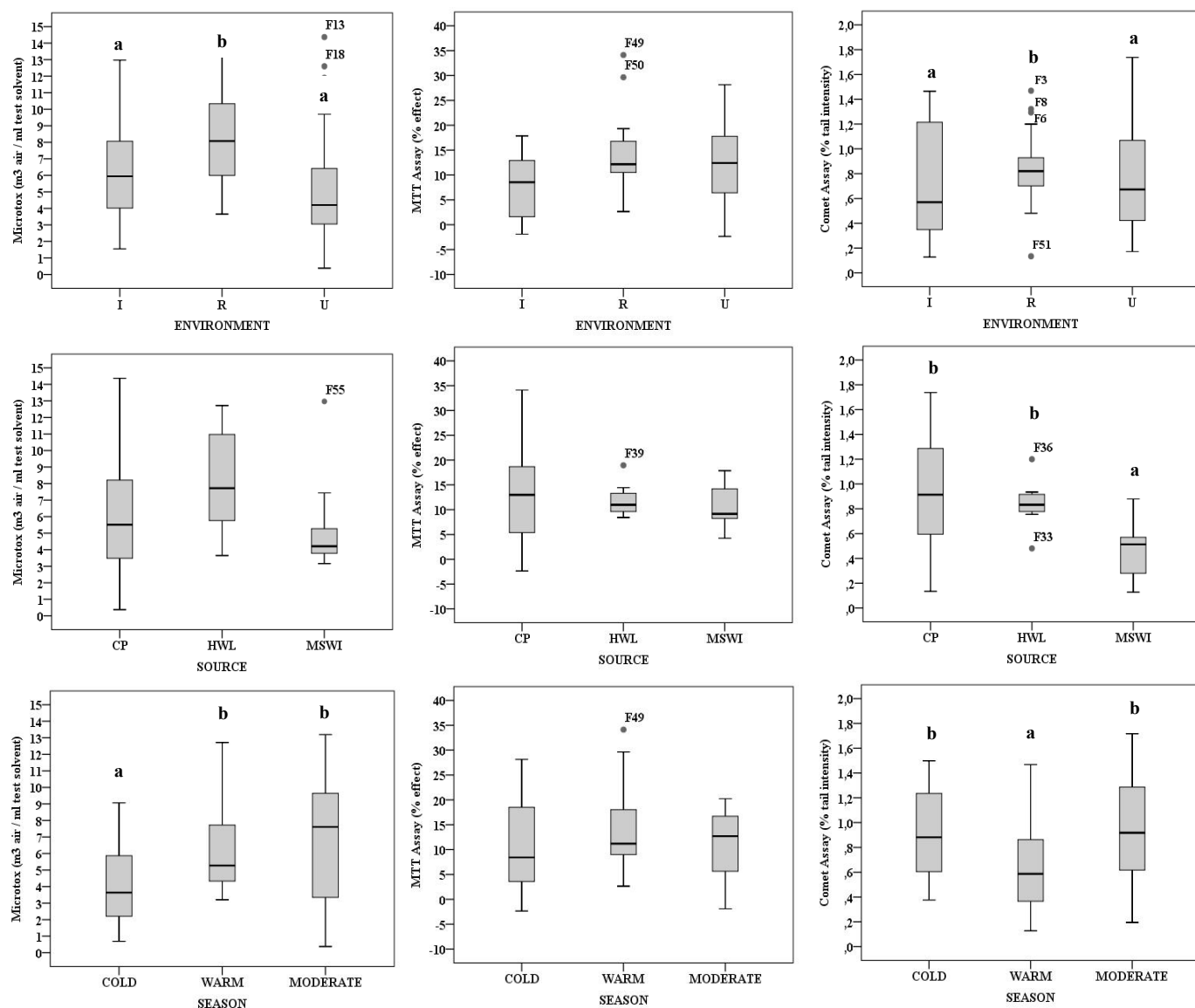


Fig. 2. Toxicity results from Microtox[®] test (EC₅₀), MTT Assay and Comet Assay (% of effect compared to positive controls), according to different categories: area of collection (I: Industrial; R: rural; U: Urban), additional sources (CP: cement plant; HWL: hazardous waste landfill; MSWI: municipal solid waste incinerator) and environmental temperature (cold, warm, moderate). Different letters (a,b) indicate significant differences between groups (p<0.05).

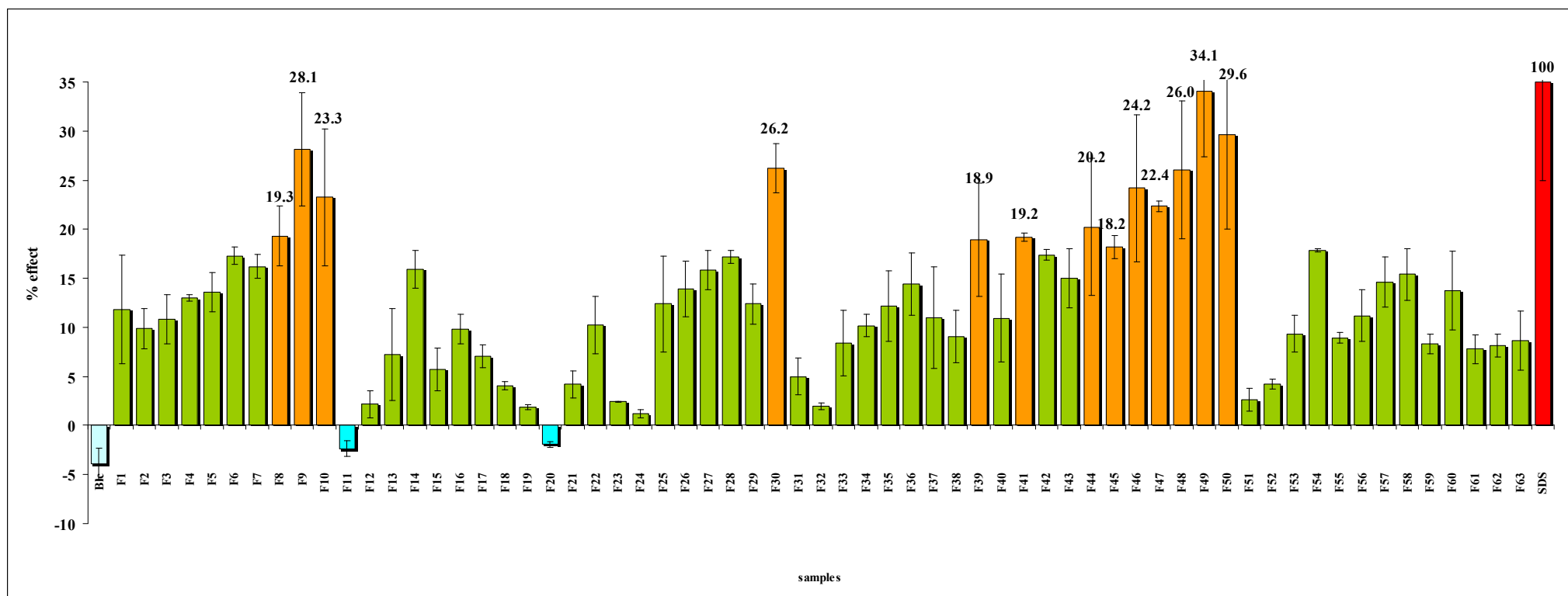


Fig. 3. Cytotoxicity results, expressed as percentage of effect compared to the positive control. In blue, blank and samples with no negative effect. In green, marginally cytotoxic samples (<18%). In orange, cytotoxic samples (>18%). In red, positive control (sodium dodecyl sulphate, SDS).

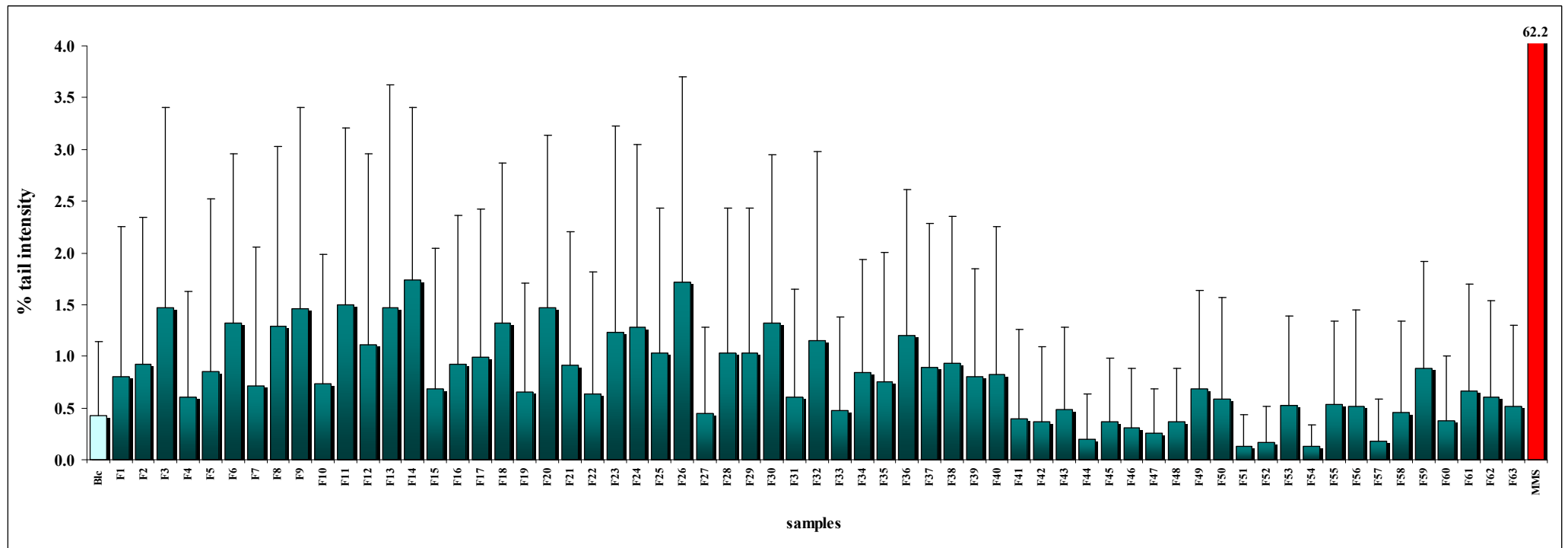


Fig. 4. Comet Assay, represented as percentage of tail intensity with respect to positive control (methyl methanesulfonate, MMS). In light blue, blank. In red, positive control.

When considering potential emission sources located in the surroundings, samples collected in the area of influence of cement plants presented significant higher concentrations of some PCDD/F congeners (2,3,7,8-TCDD, 1,2,3,7,8-PeCDD, 1,2,3,4,7,8-HxCDD, 2,3,7,8-TCDF, 1,2,3,7,8-PeCDF, and 2,3,4,6,7,8-HxCDF), in comparison to those samples collected near to waste incinerators. As previously suggested (Lee and Jones, 1999), PCDD/F levels in air significantly increased in winter. When temperature increases, the percentage of PCDD/Fs in the particle phase seems to decrease, reflecting a reduction of the environmental burdens of these contaminants. Generally, higher concentrations of anthropogenic elements have been registered in cold seasons (Gualtieri et al., 2009; Toscano et al., 2011). This fact has been linked to the increase of fossil fuel combustion and the inhibition of pollution dispersive mechanisms of pollutants, such as thermal inversions or anticyclonic pollution episodes, which may occur in winter in this Mediterranean area (Marcazzan et al., 2001; Pey et al., 2010; Rodríguez et al., 2002; Toscano et al., 2011).

The ecotoxicity results obtained by means of Microtox[®] Test, expressed as m³ of air/mL of test solvent, as well as TI values, are depicted in Fig. 1. According to TI data, 12.6% of samples were considered ‘highly toxic’, being all of them located in urban or industrial areas under the influence of a cement factory. In turn, 34.9% and 52.3% of samples were considered as ‘moderately’ and ‘marginally’ toxic, respectively. Finally, none of the samples was classified as ‘non toxic’ according to the TI. A correlation study was performed between the concentrations of metals and PCDD/F congeners in air and the results of the Microtox[®] test (Table 1). All the elements, excepting Cr and Tl, were significantly and negatively correlated with the Microtox[®] bioassay outcomes, which corroborates that these elements are toxic to *V. fischeri* (Fulladosa et al., 2005; Ocampo-Duque et al., 2008; Roig et al., 2011). Moreover, all PCDD/F congeners presented significant correlations with that test. In turn, no correlation was noted between Microtox[®] test and PM₁₀ concentrations. It could be partially due to the highly variable composition of PM₁₀, whose toxicity may be associated to only a few chemicals. These findings clearly reflect the suitable use of the Microtox[®], as a preliminary test for assessing particle-phase air pollution. Figure 2 represents the boxplots of the ecotoxicity, cytotoxicity and ecotoxicity tests, according to 3 categories: kind of zone, source and season. Urban samples seemed to be significantly more toxic than samples from rural areas (5.2 vs. 8.1 m³ of air/mL of test solvent), indicating the important role of traffic as releaser of atmospheric pollutants, in general, and PM₁₀-associated contaminants, in particular (de Kok et al., 2006; Querol et al., 2004; Triolo et al., 2008). Regarding temperature, samples collected in the cold season were more toxic than those obtained in

moderate or warm temperatures. No significant differences were appreciated in Microtox[®] toxicity taking into account the presence of additional pollutant sources. In fact, those samples from the surroundings of a cement plant did not show the highest levels. Higher toxicity in winter samples could be explained by the higher concentrations of anthropogenic elements in cold seasons, especially for PCDD/Fs, as above mentioned. Furthermore, the presence of secondary inorganic aerosols could have a notable impact on the increase of toxicity in samples collected in cold seasons (Pey et al., 2010).

Cytotoxicity results (MTT Assay), expressed as the mean percentage decrease of viable cells with respect to positive controls, are shown in Fig. 3. A wide range of values was observed, from negative results (no effect) to 34% of affectation. Twenty-one percent of the samples presented a percentage of decrease >18%, suggesting human lung cell toxicity. No significant differences were noted according to the area of collection, the additional pollution source, or the season (Fig. 2). This finding is not in agreement with the results reported by Gualtieri et al. (2010, 2012), who observed that air particulate matter of Milan (Italy) was more correlated with cytotoxic and genotoxic effects in winter than in summer. Concerning genotoxicity, some significant differences were found in the different scenarios proposed. However, it must be remarked that all results were below 4% of effect (Fig. 4). It suggests that differences are potentially linked to mathematical treatment, and its biological significance is excluded. Values from cytotoxicity and genotoxicity tests did not show a correlation with chemical pollutants as high as the Microtox[®] bioassay. Cytotoxicity (MTT Assay) presented a significant positive correlation with As and Tl ($p < 0.01$), probably due to its capacity to produce reactive oxygen species (ROS), which are responsible of decreased mitochondrial functionality, cell damage, and death (Hanzel and Verstraeten, 2006; Shi et al., 2004). In contrast, no PCDD/F congeners were correlated with cytotoxicity. Although Comet Assay results suggest that there are no genotoxicity effect in the studied samples, surprisingly significant positive correlations were found for Cr ($p < 0.01$), as well as for PCDD/F congeners. Both Cr and 2,3,7,8-TCDD have been identified as carcinogenic agents by regulatory organizations. When comparing exclusively the behavior of the 3 evaluated assays (Microtox[®], MTT and Comet assays), no correlations were appreciated, probably due to the fact that toxicity mechanism of each pollutant in each target cell is different. Microtox[®] seems to be suitable for a general evaluation of PM₁₀-bound air pollution. In turn, cytotoxicity and genotoxicity tests may be useful tools for the assessment of local environments with an increase of specific pollutants, as they were more correlated with Tl and PM₁₀, respectively.

Table 1
 Spearman correlations between pollutants and toxicity tests.

	Microtox Assay	MTT Assay	Comet Assay
As	-.260*	.430**	NS
Cd	-.504**	NS	NS
Co	-.231*	NS	NS
Cr	NS	.NS	.374**
Cu	-.425**	.NS	-.403**
Mn	-.358**	.NS	-.261*
Ni	-.467**	NS	-.266*
Pb	-.430**	NS	NS
Sb	-.414**	.NS	NS
Sn	-.537**	.NS	NS
Tl	NS	.577**	-.283*
V	-.278*	NS	-.322**
Zn	-.570**	NS	NS
PM ₁₀	NS	NS	.242*
2,3,7,8-TCDD	-.223*	NS	.300**
1,2,3,7,8-PeCDD	-.366**	NS	.232*
1,2,3,4,7,8-HxCDD	-.386**	NS	.255*
1,2,3,6,7,8-HxCDD	-.407**	NS	.217*
1,2,3,7,8,9-HxCDD	-.388**	NS	.210*
1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	-.392**	NS	.228*
OCDD	-.440**	NS	NS
2,3,7,8-TCDF	-.350**	NS	NS
1,2,3,7,8-PeCDF	-.386**	NS	NS
2,3,4,7,8-PeCDF	-.356**	NS	NS
1,2,3,4,7,8-HxCDF	-.390**	NS	NS
1,2,3,6,7,8-HxCDF	-.367**	NS	NS
1,2,3,7,8,9-HxCDF	-.427**	NS	NS
2,3,4,6,7,8-HxCDF	-.301**	NS	.307*
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	-.381**	NS	NS
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	-.305**	NS	NS
OCDF	-.325**	NS	NS

*p< 0.05; **p<0.01; NS: no significant. TC:tetrachlorinated; PeC: pentachlorinated; HxC:hexachlorinated; HpC: heptachlorinated; OC: octachlorinated; DD: dibenzo-*p*-dioxins; DF: fibenzofurans.

4. Conclusions

The results of the current study corroborates that short-term bioassays using lung human cells and environmental species, such as *Vibrio fischeri*, could be relevant to complete the routine chemical analysis and to obtain a preliminary screening of the potential effects of PM₁₀-associated airborne pollutants on human and environmental health. Furthermore, we here present a very quick and innovative system for the integration of ecotoxicity tests and human toxicity assays to preliminarily assess the airborne PM₁₀ toxicity. Microtox[®] assay was identified as an excellent screening test to perform a first evaluation of air quality, as it

presented very significant correlation values with metals and PCDD/Fs. In contrast, MTT Assay presented very low correlation with the same pollutants. Although none of the samples exhibited genotoxicity, a high correlation was found between this *in vitro* test and carcinogenic agents. Urban samples from traffic-impacted areas seemed to be significantly more toxic. Finally, environmental temperature was identified as a key parameter, as higher values of ecotoxicity were found in winter.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Joaquim de Lapuente (CERETOX, University of Barcelona) for helping in the performance and interpretation of MTT and Comet Assays.

References

- Appenzeller BM, Tsatsakis AM. Hair analysis for biomonitoring of environmental and occupational exposure to organic pollutants: state of the art, critical review and future needs. *Toxicol Lett* 2012;210:119-40.
- ASTM. Standard guide for determining DNA single-strand damage in eukaryotic cells using the Comet Assay. Designation: E 2186 – 02a. Designation: E 2186 – 02a. ASTM International, 2010.
- Barbounis EG, Tzatzarakis MN, Alegakis AK, Kokkinaki A, Karamanos N, Tsakalof A, Tsatsakis AM. Assessment of PCBs exposure in human hair using double focusing high resolution mass spectrometry and single quadrupole mass spectrometry. *Toxicol Lett* 2012;210:225-31.
- Cavanagh JA, Trought K, Brown L, Duggan S. Exploratory investigation of the chemical characteristics and relative toxicity of ambient air particulates from two New Zealand cities. *Sci Total Environ* 2009;407:5007-18.
- Clemons JH, Allan LM, Marvin CH, Wu Z, McCarry BE, Bryant DW, et al. Evidence of estrogen- and TCDD-Like activities in crude and fractionated extracts of PM₁₀ air particulate material using *in vitro* gene expression assays. *Environ Sci Technol* 1998;32:1853-60.
- Covaci A, Tutudaki M, Tsatsakis AM, Schepens P. Hair analysis: another approach for the assessment of human exposure to selected persistent organochlorine pollutants. *Chemosphere* 2002;46:413-8.
- de Kok TCM, Driee HAL, Hogervorst JGF, Briedé JJ. Toxicological assessment of ambient and traffic-related particulate matter: A review of recent studies. *Mutat Res* 2006;613:103-22.
- EC. European Commission. Directive 2008/50/EC of the European Parliament and of the Council of 21 May 2008 on ambient air quality and cleaner air for Europe. Technical Report 2008/50/EC, L152, Off J Eur Comm, 2008.

- Evagelopoulos V, Zoras S, Samaras P, Triantafyllou AG, Albanis TA, Kassomenos P. Toxicity of fine and coarse atmospheric particles using *Vibrio fischeri*. 2nd International Conference on Environmental Management, Engineering, Planning and Economics & SECOTOX Conference. Aristotle University of Thessaloniki, Greece, 2009.
- Fulladosa E, Murat JC, Martínez M, Villaescusa I. Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri* bacteria. *Chemosphere* 2005;60:43-8.
- Gualtieri M, Longhin E, Mattioli M, Mantecca P, Tinaglia V, Mangano E, et al. Gene expression profiling of A549 cells exposed to Milan PM_{2.5}. *Toxicol Lett* 2012;209:136-45.
- Gualtieri M, Mantecca P, Corvaja V, Longhin E, Perrone MG, Bolzacchini E, et al. Winter fine particulate matter from Milan induces morphological and functional alterations in human pulmonary epithelial cells (A549). *Toxicol Lett* 2009;188:52-62.
- Gualtieri M, Øvrevik J, Holme JA, Perrone MG, Bolzacchini E, Schwarze PE, et al. Differences in cytotoxicity versus pro-inflammatory potency of different PM fractions in human epithelial lung cells. *Toxicol In Vitro* 2010;24:29-39.
- Gunawardena J, Egodawatta P, Ayoko GA, Goonetilleke A. Role of traffic in atmospheric accumulation of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Atmos Environ* 2012;54:502-10.
- Hanzel CE, Verstraeten SV. Thallium induces hydrogen peroxide generation by impairing mitochondrial function. *Toxicol Appl Pharmacol* 2006;216:485-92.
- Herngren L, Goonetilleke A, Ayoko GA. Analysis of heavy metals in road-deposited sediments. *Anal Chim Acta* 2006;571:270-8.
- INVITTOX protocol No. 17. MTT assay. The ERGATT/FRAME data bank of *in vitro* techniques in toxicology. Nottingham, UK:INVITTOX; 1990.
- Kemp K. Trends and sources for heavy metals in urban atmosphere. *Nucl Instrum Method Phys Res B* 2002;189:227-32.
- Kováts N, Ács A, Kovács A, Ferincz Á, Turóczy B, Gelencsér A. Direct contact test for estimating the ecotoxicity of aerosol samples. *Environ Toxicol Pharmacol* 2012;33:284-7.
- Lee RGM, Jones KC. Gas-particle partitioning of atmospheric PCDD/Fs: Measurements and observations on modeling. *Environ Sci Technol* 1999;33:596-604.
- Leung AOW, Zheng J, Yu CK, Liu WK, Wong CKC, Cai Z, et al. Polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans in surface dust at an e-waste processing site in Southeast China. *Environ Sci Technol* 2011;45:5775-82.
- Marcazzan GM, Vaccaro S, Valli G, Vecchi R. Characterisation of PM₁₀ and PM_{2.5} particulate matter in the ambient air of Milan (Italy). *Atmos Environ* 2001;35:4639-50.
- Ocampo-Duque W, Sierra J, Ferré-Huguet N, Schuhmacher M, Domingo JL. Estimating the environmental impact of micro-pollutants in the low Ebro River (Spain): An approach based on screening toxicity with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere* 2008;72:715-21.

- Park SY, Choi J. Cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity assay using human cell and environmental species for the screening of the risk from pollutant exposure. *Environ Int* 2007;33:817-22.
- Pelucchi C, Negri E, Gallus S, Boffetta P, Tramacere I, La Vecchia C. Long-term particulate matter exposure and mortality: a review of European epidemiological studies. *BMC Public Health* 2009;9:453
- Pérez N, Pey J, Castillo S, Viana M, Alastuey A, Querol X. Interpretation of the variability of levels of regional background aerosols in the Western Mediterranean. *Sci Total Environ* 2008;407:527-40.
- Pérez N, Pey J, Cusack M, Reche C, Querol X, Alastuey A, et al. Variability of particle number, black carbon, and PM₁₀, PM_{2.5}, and PM₁ levels and speciation: Influence of road traffic emissions on urban air quality. *Aerosol Sci Technol* 2010;44:487-99.
- Pey J, Pérez N, Querol X, Alastuey A, Cusack M, Reche C. Intense winter atmospheric pollution episodes affecting the Western Mediterranean. *Sci Total Environ* 2010;408:1951-9.
- Querol X, Alastuey A, Ruiz CR, Artiñano B, Hansson HC, Harrison RM, et al. Speciation and origin of PM₁₀ and PM_{2.5} in selected European cities. *Atmos Environ* 2004;38:6547-55.
- Rodríguez S, Querol X, Alastuey A, Viana M-M, Mantilla E. Events affecting levels and seasonal evolution of airborne particulate matter concentrations in the Western Mediterranean. *Environ Sci Technol* 2002;37:216-22.
- Roig N, Nadal M, Sierra J, Ginebreda A, Schuhmacher M, Domingo JL. Novel approach for assessing heavy metal pollution and ecotoxicological status of rivers by means of passive sampling methods. *Environ Int* 2011;37:671-7.
- Roig N, Sierra J, Nadal M, Martí E, Navalón-Madrigal P, Schuhmacher M, et al. Relationship between pollutant content and ecotoxicity of sewage sludges from Spanish wastewater treatment plants. *Sci Total Environ* 2012;425:99-109.
- Rovira J, Mari M, Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL. Environmental monitoring of metals, PCDD/Fs and PCBs as a complementary tool of biological surveillance to assess human health risks. *Chemosphere* 2010a;80:1183-9.
- Rovira J, Mari M, Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL. Partial replacement of fossil fuel in a cement plant: Risk assessment for the population living in the neighborhood. *Sci Total Environ* 2010b;408:5372-80.
- Rovira J, Mari M, Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL. Levels of metals and PCDD/Fs in the vicinity of a cement plant: Assessment of human health risks. *J Environ Sci Health A* 2011a;46:1075-84.
- Rovira J, Mari M, Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL. Use of sewage sludge as secondary fuel in a cement plant: human health risks. *Environ Int* 2011b;37:105-11.

- Rovira J, Mari M, Schuhmacher M, Nadal M, Domingo J. Monitoring Environmental Pollutants in the Vicinity of a Cement Plant: A Temporal Study. *Arch Environ Contam Toxicol* 2011c;60:372-84.
- Rovira J, Mari M, Schuhmacher M, Nadal M, Domingo J. Environmental pollution and health risks near a hazardous waste landfill. Temporal trends. *J Risk Anal Crisis Response* 2012;2:13-20.
- Schilirò T, Alessandria L, Degan R, Traversi D, Gilli G. Chemical characterisation and cytotoxic effects in A549 cells of urban-air PM10 collected in Torino, Italy. *Environ Toxicol Pharmacol* 2010;29:150-7.
- Shi H, Shi X, Liu KJ. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 2004;255:67-78.
- Sternbeck J, Sjödin Å, Andréasson K. Metal emissions from road traffic and the influence of resuspension - results from two tunnel studies. *Atmos Environ* 2002;36:4735-44.
- Toscano G, Moret I, Gambaro A, Barbante C, Capodaglio G. Distribution and seasonal variability of trace elements in atmospheric particulate in the Venice Lagoon. *Chemosphere* 2011;85:1518-24.
- Traversi D, Alessandria L, Schilirò T, Gilli G. Size-fractionated PM₁₀ monitoring in relation to the contribution of endotoxins in different polluted areas. *Atmos Environ*. 2011;45:3515-21.
- Triolo L, Binazzi A, Cagnetti P, Carconi P, Correnti A, De Luca E, et al. Air pollution impact assessment on agroecosystem and human health characterisation in the area surrounding the industrial settlement of Milazzo (Italy): a multidisciplinary approach. *Environ Monit Assess* 2008;140:191-209.
- Tsatsakis A, Tutudaki M. Progress in pesticide and POPs hair analysis for the assessment of exposure. *Forensic Sci Int* 2004;145:195-9.
- USEPA. Method 3051A. Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. United States Environmental Protection Agency, 2007. Available at <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3051a.pdf>.
- Usman ARA. The relative adsorption selectivities of Pb, Cu, Zn, Cd and Ni by soils developed on shale in New Valley, Egypt. *Geoderma* 2008;144:334-43.
- Valavanidis A, Fiotakis K, Vlachogianni T. Airborne particulate matter and human health: Toxicological assessment and importance of size and composition of particles for oxidative damage and carcinogenic mechanisms. *J Environ Sci Health C* 2008;26:339-62.
- Vilavert L, Nadal M, Mari M, Schuhmacher M, Domingo JL. Modification of an environmental surveillance program to monitor PCDD/Fs and metals around a municipal solid waste incinerator. *J Environ Sci Health A* 2009;44:1343-52.
- Vilavert L, Nadal M, Rovira J, Schuhmacher M, Domingo JL. Air passive sampling for the screening of inhalation risks of POPs near an incineration plant. *Hum Ecol Risk Assess* 2012. DOI:10.1080/10807039.2012.701990.

- Vouitsis E, Ntziachristos L, Pistikopoulos P, Samaras Z, Chrysikou L, Samara C, et al. An investigation on the physical, chemical and ecotoxicological characteristics of particulate matter emitted from light-duty vehicles. *Environ Pollut* 2009;157:2320-7.
- Wang W, Jariyasopit N, Schrlau J, Jia Y, Tao S, Yu T-W, et al. Concentration and photochemistry of PAHs, NPAHs, and OPAHs and toxicity of PM_{2.5} during the Beijing Olympic Games. *Environ Sci Technol* 2011;45:6887-95.
- WHO, World Health Organization. Health risks of particulate matter from long-range transboundary air pollution. Joint WHO/Convention Task Force on the Health Aspects of Air Pollution. Copenhagen, Denmark, 2006.
- Yamamoto H, Tamura I, Hirata Y, Kato J, Kagota K, Katsuki S, et al. Aquatic toxicity and ecological risk assessment of seven parabens: Individual and additive approach. *Sci Total Environ* 2011;410-411:102-11.
- Zhao Y, Duan L, Xing J, Larssen T, Nielsen CP, Hao J. Soil acidification in China: Is controlling SO₂ emissions enough? *Environ Sci Technol* 2009;43:8021-6.

DISCUSSIÓ DEL CAPÍTOL V

En aquest capítol, s'ha estudiat la viabilitat de diferents tests *in vitro* per avaluar la toxicitat d'extractes aquosos de partícules PM₁₀ de l'aire. S'ha estudiat la idoneïtat de tests d'ecotoxicitat (Microtox), citotoxicitat (MTT Assay) i genotoxicitat (Comet Assay) com a complement de les anàlisis químiques rutinàries de qualitat d'aire. S'ha avaluat també la influència que tenen alguns paràmetres com la localització, la presència de fonts d'emissió secundàries o la temperatura ambiental en la càrrega de contaminants i el grau de toxicitat de les mostres d'aire. Per últim, també s'ha estudiat la correlació entre els contaminants analitzats i el grau de toxicitat.

Les concentracions més elevades de **metalls** associats a partícules PM₁₀ s'han trobat en àrees urbanes i industrials, coincidint amb els resultats de la bibliografia científica (Toscano et al., 2011) essent els nivells de Cd, Ni, Pb i Zn significativament superiors en àrees industrials i urbanes respecte les zones rurals. Així mateix, les concentracions de **PCDD/Fs** en àrees urbanes han estat en la majoria dels casos superiors que les concentracions en zones rurals. Relatiu a la proximitat de fonts d'emissió secundàries, únicament elements com el cadmi o el plom han presentat nivells significativament superiors en zones influenciades per cimenteres i incineradores respecte les àrees influenciades per abocadors. Aquest fet es deu principalment a l'associació d'aquests elements amb els processos de combustió (Sternbeck et al., 2002). Únicament els nivells d'algunes PCDD/Fs han presentat concentracions significativament superiors en els mostrejos realitzats a l'hivern respecte els realitzats la resta de l'any.

Respecte a l'aplicació dels diferents bioassajos en les mostres d'aire, un 12.6% de les mostres s'ha catalogat com a 'molt tòxiques' segons el test de *Vibrio fischeri*, essent aquelles situades en zones urbanes i mostrejades a l'hivern significativament més tòxiques que les situades en zones rurals i mostrejades en èpoques de temperatures més elevades. No s'ha observat diferències significatives en l'ecotoxicitat segons la influència de fonts d'emissió secundàries. Tots els metalls excepte el Cr el Tl, han correlacionat significativament i negativament amb els resultats del Microtox, fet que corrobora la toxicitat d'aquests elements vers *Vibrio fischeri*. Així mateix, tots els congèneres de PCDD/Fs també han presentat correlació significativa amb els resultats

d'aquest test. Aquests resultats reflecteixen la idoneïtat del test Microtox[®] com un test preliminar per estudiar la contaminació associada a la fracció particulada de l'aire

Tot i que la concentració de metalls en aire es trobava per sota els nivells reglamentaris, un 20% de les mostres presentaren citotoxicitat (**MTT Assay**) en cèl·lules pulmonars cultivades *in vitro* (línia A549). No s'observaren diferències significatives segons la zona de mostreig, les fonts d'emissió secundàries o la temperatura ambiental. Únicament l'As i el Tl mostraren correlació amb el grau de citotoxicitat, segurament degut a la seva capacitat de produir radicals lliures d'oxigen responsables de dany i mort cel·lular (Hanzel i Verstraeten, 2006; Shi et al., 2004). A part dels metalls retinguts a les PM₁₀, segurament altres components presents a l'aire s'hi retenen i poden acabar provocant danys a les cèl·lules que hi estiguin en contacte. Per últim, tot i que cap de les mostres ha presentat efectes a nivell genètic (**Comet Assay** amb cèl·lules pulmonars de la línia A549), els baixos resultats de genotoxicitat, han presentat bona correlació amb elements considerats carcinogènics com el Cr i certs congèneres de PCDD/Fs (IARC, 1997b; USEPA, 2000b).

Aquest estudi corrobora que l'aplicació de bioassajos de curta durada utilitzant cèl·lules pulmonars humanes o espècies ambientals, com *Vibrio fischeri*, poden ser rellevants per a completar les anàlisis químiques de rutina i obtenir una anàlisi preliminar dels efectes potencials de les mescles de contaminants associades a PM₁₀, tant en la salut humana com ambiental. S'ha presentat un sistema ràpid i innovador per tal d'integrar tests d'ecotoxicitat i de toxicitat humana pels estudis preliminars de la toxicitat de les PM₁₀ de l'aire. El test Microtox[®] s'ha identificat com un test excel·lent d'*screening* per a tenir una primera avaluació de la qualitat de l'aire, degut a la seva bona correlació amb els nivells de metalls i PCDD/Fs. Els paràmetres més relacionats amb el nivell de contaminació de les PM₁₀ i la seva toxicitat, han resultat ser la proximitat a zones urbanes i en menor mesura, les baixes temperatures ambientals.

CAPÍTOL VI
DISCUSSIÓ GENERAL I CONCLUSIONS

1. Discussió general

Aquesta tesi, ha permès observar la utilitat de combinar les anàlisis químiques rutinàries amb assajos d'ecotoxicitat i toxicitat adients per a cada matriu per a tenir un bon diagnòstic ambiental i ecotoxicològic de les diferents matrius ambientals.

Quan s'estudien mostres ambientals, aquestes contenen gran multitud de compostos químics i biològics potencialment tòxics, difícils de caracteritzar en la seva totalitat. Per aquest motiu, es considera interessant completar els estudis químics de rutina, amb tècniques ràpides i senzilles que puguin avaluar l'ecotoxicitat global de les mostres ambientals.

Per a l'anàlisi de la toxicitat d'**aigües fluvials**, s'ha comprovat que l'exposició directa dels organismes diana seleccionats (bacteris i algues) a l'aigua no permet detectar toxicitat, probablement perquè els contaminants es troben a concentracions massa baixes. Com a variant, s'ha proposat l'ús de mostrejadors passius (DGT i SPMD) que permeten concentrar els contaminants i per tant detectar toxicitat. Aquests dispositius estan dissenyats per adsorbir la fracció biodisponible de metalls i compostos orgànics, respectivament. Malgrat tot, tenen certes limitacions. Entre aquestes, convé destacar per exemple que els DGTs (amb resina *Chelex*) no permeten el mostreig de metalls que formen oxianions (Cr^{6+} , As, V...) ni tampoc el Hg. Per aquesta raó, s'han començat a comercialitzar altres resines, com les d'òxids de ferro (ferrihidrita) que permeten l'intercanvi aniònic. Per tant, si es vol valorar la toxicitat derivada de metalls, convindria usar ambdós tipus de dispositius. Els SPMDs han permès el mostreig de contaminants lipòfils ($\log K_{ow} > 3$) com ara PAHs, hexaclorociclohexans, hexaclorbenzè, nonilfenols i nonilfenols etoxilats i valorar-ne la seva toxicitat. Per al mostreig de compostos orgànics més hidrofílics caldria fer ús de dispositius alternatius.

Els **sediments** acumulen la major part de la càrrega contaminant, i per tant és convenient valorar-ne també la seva toxicitat. Els extractes aquosos denoten més baixa toxicitat que els orgànics, fet lògic ja que el pas de les aigües fa que es rentin aquells contaminants més disponibles i s'acumulin els més afins a les característiques del sediment (lipòfils i metalls bloquejats). Una manera de resoldre aquest fet, tenint en compte que l'anàlisi de metalls totals ha manifestat nivells de contaminació prou elevats de bona part dels rius de Catalunya, seria usant un extractant més agressiu (àcid).

Tanmateix, en aquest cas s'estaria valorant quelcom més que la toxicitat de la fracció disponible.

Pel que fa als organismes diana utilitzats, l'alga d'aigua dolça *Pseudokirschneriella subcapitata* i el bacteri luminescent *Vibrio fischeri*, semblen adequats com a representants de microorganismes autòtrofs i heteròtrofs, respectivament. Ambdós, s'han mostrat molt sensibles a la contaminació tant per contaminants orgànics com metalls, correlacionant relativament bé amb els contaminants trobats. L'alga ha correlacionat millor amb la presència de metalls (Zn, As, Cr, Cd i Hg) i en canvi el bacteri ha presentat millor correlació amb la presència de contaminants orgànics (fluorè, l'hexaclorociclohexà, l'hexaclorobenzè i els nonilfenols). És per aquest motiu, que es podria afirmar que són assajos força complementaris, a més de ser tests test ràpids i senzills de dur a terme. A partir dels resultats obtinguts, *Vibrio fischeri* semblaria ser més sensible que *Pseudokirschneriella subcapitata* a l'hora de valorar l'ecotoxicitat dels contaminants de l'aigua, tant directament com a través dels extractes de captadors passius, o bé l'associada a la fracció orgànica dels sediments. En canvi, a l'hora de valorar l'ecotoxicitat associada a la fracció polar del sediments, l'alga és més sensible. Una de les limitacions dels extractes orgànics és la necessitat de fer un canvi de dissolvent per un de compatible (DMSO) amb el bioassaig. Aquesta etapa requereix operar amb molta cura per evitar traces de dissolvents que podrien sobrevalorar la toxicitat.

En relació als **fangs de depuradora**, convé incidir que són residus orgànics molt complexos i contenen gran diversitat de contaminants. Tenint en compte que bona part d'ells s'aplicaran al sòl, s'ha vist adequat aplicar tests relacionats amb aquesta matriu. L'ús de test amb plantes (ceba, raves i raigràs) ha permès valorar-ne la fitotoxicitat. Tot i que els raves s'han mostrat més sensibles, les tres espècies han presentat certa sensibilitat davant un fang fitotòxic. El test amb *Vibrio fischeri* també ha mostrat molta sensibilitat, tant per a contaminants hidrosolubles com liposolubles. Aquest fet és lògic ja que els components nocius del fang són molt biodisponibles, pel fet que aquests residus no tenen una matriu capaç de bloquejar contaminants a diferència dels sediments o els sòls. En canvi els fangs compostats que tenen la matèria orgànica més humificada (anàlogament al sòl) són capaços de retenir aquests compostos nocius, alhora que contenen menys substàncies presents en la matèria orgànica fresca (àcids orgànics, fenols...), i per tant manifesten menor toxicitat. En aquesta tesi s'ha posat de manifest

que a l'hora de tractar els fangs de depuradora, l'estabilització mitjançant compostatge seguit dels tractaments tèrmics semblen ser els tractaments més adequats per detoxificar els fangs que han de ser reciclats a través del sòl. Una de les limitacions que presenten els assajos d'aquest tipus de matriu amb plantes, pot ser la salinitat dels extractes (>2-4 dS/m). És per això, que la utilització al mateix temps d'un bioassaig amb un bacteri marí (resistent a la salinitat) podria ser una tècnica força complementària.

Per tal d'estudiar els efectes de la contaminació (especialment derivada de l'ús de fangs de depuradores) sobre la matriu **sòl** els assajos de toxicitat proposats aquí han estat relacionats amb la mineralització de la matèria orgànica, ja que són funcions bàsiques del sòl i són fonamentals per metabolitzar el fang aportat. D'aquests tests, els més sensibles han estat els relacionats amb la mineralització del nitrogen i l'activitat enzimàtica ureasa, tots dos implicats en el cicle del nitrogen. L'alteració d'aquest cicle s'ha vist que podria comportar desequilibris en la relació C/N de la matèria orgànica del sòl, fet que pot comportar a la llarga la contaminació d'aigües per lixiviació i/o escolament superficial de formes mòbils de nitrogen (especialment nitrats). Aquest fet s'ha posat de manifest en un estudi de camp on s'havien aportat fangs compostats a dosis poc controlades i de forma reiterada, alhora que també s'ha constatat l'acumulació de metalls (Cu i Zn) a concentracions per sobre dels nivells habituals en sòls catalans (nivells genèrics de referència). L'ús de test amb plantes per detectar fitotoxicitat ha estat també de molta utilitat. S'ha pogut observar que dosis d'aplicació de fang elevades i reiterades ($80 \text{ Mg ha}^{-1}\text{any}^{-1}$), poden provocar fitotoxicitat, fet que podria indicar que es pot haver superat la capacitat de bloqueig del sòl. Aquest fet podria comportar reduccions de producció en cas de cultius herbacis. La utilització del test amb *Vibrio fischeri* en sòls s'ha orientat sobretot en la protecció de les aigües (una de les funcions de la matriu sòl), de manera que s'ha avaluat l'ecotoxicitat en extractes aquosos. L'aportació reiterada de fangs no ha permès demostrar que hi hagi un perill significatiu per les aigües, quant a la seva toxicitat. L'ús d'un extractant més agressiu hauria permès alliberar part dels contaminants bloquejats i, per tant, detectar toxicitat, malgrat que els resultats haurien estat de difícil interpretació.

La presència de material particulat a l'**aire** s'ha convertit en un dels problemes ambientals més rellevants de les grans ciutats, el qual està associat a greus efectes adversos sobre la salut humana. L'exposició crònica a PM_{10} s'ha relacionat amb un

increment del risc a patir càncer de pulmó, altres malalties pulmonars i arteriosclerosi. En aquest treball s'han plantejat noves metodologies de diagnòstic ràpid per valorar l'ecotoxicitat, citotoxicitat i genotoxicitat d'extractes aquosos de la fracció PM₁₀ de mostres d'aire (nivells d'immissió) de diverses zones urbanes, rurals i industrials catalanes. S'ha posat de manifest que, tot i que els nivells de contaminants analitzats es troben en la majoria dels casos per sota els límits que marca la legislació, algunes de les mostres han presentat toxicitat marcada envers *Vibrio fischeri*, així com citotoxicitat *in vitro* envers cèl·lules pulmonars de la línia A549. Per contra, no s'ha detectat genotoxicitat en cap mostra mitjançant el Comet Assay en aquest mateix tipus de cèl·lules. Aquests resultats permeten suggerir que el test del Microtox® amb *Vibrio fischeri* pot ser una bona eina complementària pels estudis de qualitat d'aire, ja que la toxicitat trobada ha presentat molt bona correlació amb els nivells de metalls i dioxines analitzats.

En resum, els treballs presentats en aquesta tesi posen de manifest que l'aplicació de bioassajos en les diferents matrius ambientals suposa un bon complement de l'anàlisi química ambiental, i la seva aplicació conjunta permet obtenir millors diagnòstics de l'estat de contaminació dels diferents compartiments ambientals.

2. Conclusions

Conclusions específiques

- La combinació de l'anàlisi de contaminants amb mètodes ecotoxicològics (*Vibrio fischeri* i *Pseudokirchneriella subcapitata*) ha estat d'utilitat per a caracteritzar la contaminació i l'ecotoxicitat dels sistemes fluvials. Aquestes metodologies podrien servir com una primera diagnosi per valorar l'estat de les aigües superficials.
- L'estudi de l'ecotoxicitat en extractes de captadors passius (DGTs i SPMDs), ha permès conèixer la toxicitat potencial de la fracció biodisponible dels contaminants presents a l'aigua, fet que no ha estat possible a partir de mostres puntuals d'aigua.
- Els dispositius DGT han permès mostrejar i alhora conèixer l'especiació de metalls catiónics que es troben en forma lliure i/o formant complexes làbils, mentre que s'ha comprovat que no són útils per al mostreig de metalls que es trobin en forma aniónica ni per a mostrejar mercuri. En canvi, són útils per detectar cadmi a concentracions molt baixes, no detectable mitjançant mostres puntuals d'aigua.
- En l'anàlisi de fangs de depuradora s'ha observat que el tipus de tractament aplicat als fangs té poca influència en la càrrega de contaminants, excepte en alguns PBDEs i compostos fenòlics, mentre que és fonamental per altres paràmetres com el contingut en matèria seca, el nitrogen i sobretot l'estabilitat de la matèria orgànica.
- L'ús de tests de germinació (raves, cebes i raigràs) ha permès valorar la fitotoxicitat de la fracció soluble dels fangs de depuradora. Els resultats d'aquest test, correlacionen positivament amb els resultats del test Microtox[®] amb *Vibrio fischeri*. En general, la toxicitat ve més donada pel grau d'estabilitat de la matèria orgànica que no pas per la pròpia càrrega de contaminants del fang.
- El grau d'estabilitat de la matèria orgànica pot ser un paràmetre important a tenir en compte a l'hora de reciclar residus orgànics a través del sòl. Així mateix, l'augment

de l'estabilitat de la matèria orgànica contribueix a disminuir el risc de contaminació per nitrogen i redueix la toxicitat del residu, tant en bacteris com en plantes.

- L'aplicació de residus orgànics (fangs i fangs compostats) en sòls agrícoles millora la quantitat i qualitat de la matèria orgànica, així com el contingut de nitrogen del sòl. Tanmateix, si l'aplicació no es realitza de manera adequada, s'incrementa el risc d'acumular-se metalls (Cu, Zn) i contaminants orgànics (fenols solubles, etc) en el sòl.
- L'aplicació de residus orgànics no provoca efectes negatius a llarg termini sobre els microorganismes responsables de la mineralització del carboni. Tot el contrari, la biomassa potencial activa s'incrementa i el quocient d'activació respiratòria baixa, indicant que es redueix l'estrès d'aquesta comunitat microbiana.
- L'aportació repetitiva i incontrolada de fangs de depuradora sobre sòls amb baixa activitat biològica provoca efectes inhibidors sobre la nitrificació i l'activitat ureàsica originant desequilibris en els cicles de C i N i la posterior mobilització de nitrats.
- *A. cepa* ha resultat ser una espècie prou sensible per detectar fitotoxicitat en sòls. L'efecte fitotòxic sembla estar relacionat amb l'acumulació d'alguns metalls (Cd, Hg, Pb, Cr, Cu, Zn) o compostos orgànics (entre ells els fenols).
- En extractes aquosos dels sòls fertilitzats, no s'ha detectat toxicitat mitjançant el test del Microtox®, probablement a causa que els metalls i contaminants orgànics estan bloquejats al sòl i són poc biodisponibles.
- Per evitar problemes d'acumulació de contaminants, de contaminació d'aigües subterrànies i de funcionament del sòl, es recomana l'aportació de fangs de depuradora urbana digerits anaeròbiament a dosis de 40 Mg ha⁻¹ cada dos anys en sòls calcaris i de textura fina.
- En base a mostres de zones industrials, urbanes i rurals de Catalunya, el factor que sembla més rellevant en la concentració de metalls i PCDD/Fs en mostres de PM₁₀, ha estat la influència urbana. Així mateix, les mostres situades en zones urbanes han presentat major toxicitat que les situades en zones rurals. Fonts de contaminació

ambiental mòbils com el trànsit de les zones urbanes podrien ser la principal causa de la toxicitat observada.

- El fet d'observar-se cert grau d'ecotoxicitat i citotoxicitat en mostres on la majoria d'elements analitzats s'han trobat per sota els límits que marca la legislació, evidencia la complexitat de les mostres ambientals. Aquesta observació enforteix la hipòtesi que sovint, la causa dels efectes tòxics observats, ve donada per les interaccions entre contaminants i l'exposició a una mescla de contaminants ambientals és la millor manera d'evidenciar-ho.
- El test d'ecotoxicitat Microtox® ha resultat ser una eina força sensible per l'anàlisi de mostres d'aire. Complementar les anàlisis químiques rutinàries de l'aire amb bioassajos *in vitro* com Microtox® amb *Vibrio fischeri* i els tests de citotoxicitat i genotoxicitat MTT Assay i Comet Assay respectivament, és una bona eina pel control ambiental de la qualitat de l'aire.

Conclusió general

L'aplicació de bioassajos específics en diferents matrius ambientals permet avaluar l'efecte de l'exposició d'organismes diana a mesclades de contaminants ambientals. Aquests tests suposen una bona eina d'"screening" per completar la informació obtinguda a partir de les anàlisis químiques que, realitzades de forma individual, poden estimar erròniament la toxicitat real de les mostres ambientals. L'ús de tècniques complementàries permet obtenir un millor diagnòstic ambiental. El test del Microtox® amb *Vibrio fischeri* ha mostrat bona complementarietat amb d'altres assajos més específics de cada matriu, a més ha resultat ser molt sensible a la presència de contaminants en aigües, sediments, fangs de depuradora i partícules d'aire PM₁₀.

Bibliografia

Alabaster, G.P., Leblanc, R.J., **2008**. In: Le Blanc, R.J., Matthews, R., Richard, R.P. (Eds.), *Global Atlas of Excreta, Wastewater, Sludge, and Biosolids Management: Moving Forward the Sustainable and Welcome Uses of a Global Resource*. *United Nations Settlement Program*, Nairobi, Kenya, pp. 344–550.

Alba-Tercedor J., Jaimez-Cuéllar P., Álvarez M., Avilés J., BONADA N., CASAS J., Mellado A., Ortega M., Pardo I., Prat N., Rieradevall M., Robles S., Sáinz-Cantero C. E., Sánchez-Ortega A., Suárez M. L., Toro M., Vidal-Abarca R., Vivas S., i Zamora-Muñoz C. **2002**. Caracterización del estado ecológico de los ríos mediterráneos ibéricos mediante el índice IBMWP (antes BMWP). *Limnetica*, 21: 175-185.

Andrew, R.W., Biesinger K.E., Glass G.E. **1977**. Effects of inorganic complexing on the toxicity of copper in *Daphnia magna*. *Water Research*. 11: 309-315.

ASTM. **2010**. Standard Guide for Determining DNA Single-Strand Damage in Eukaryotic Cells Using the Comet Assay. In Designation: E 2186 – 02a, *ASTM International*; Vol. Designation: E 2186 – 02a.

ATSDR. **2011a**. Toxicological Profile for Antimony. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Public. <http://www.atsdr.cdc.gov/>

ATSDR. **2011b**. Toxicological Profile for Cadmium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Public. <http://www.atsdr.cdc.gov/>

ATSDR. **2011c**. Toxicological Profile for Cobalt. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Public. <http://www.atsdr.cdc.gov/>

ATSDR. **2011d**. Toxicological Profile for Mercury. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Public. <http://www.atsdr.cdc.gov/>

ATSDR. **2011e**. Toxicological Profile for Tin and compounds. Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Public. <http://www.atsdr.cdc.gov/>.

ATSDR. **2011f**. Toxicological Profile for Thallium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Public. <http://www.atsdr.cdc.gov/>.

ATSDR. **2011g**. Toxicological Profile for Vanadium. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Public. <http://www.atsdr.cdc.gov/>.

ATSDR. **2011h**. Toxicological Profile for Zinc. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. U.S. Department of Health and Human Services, Public. <http://www.atsdr.cdc.gov/>

Augulyte L, Bergqvist PA. **2007**. Estimation of water sampling rates and concentrations of PAHs in a municipal sewage treatment plant using SPMDs with Performance Reference Compounds. *Environmental Science & Technology*. 41:5044–9.

Azur Environmental, **1999**. Microtox Omni® Software for Windows 95/98/NT. 443 Azur Environmental, Carlsbad, CA, 444 USA.

Baars, A.J., Bakker, M.I., Baumann, R.A., Boon, P.E., Freijer, J.I., Hoogenboom, L.A.P., Hoogerbrugge, R., van Klaveren, J.D., Liem, A.K.D., Traag, W.A., de Vries, J., **2004**. Dioxins, dioxin-like PCBs and non-dioxin-like PCBs in foodstuffs: occurrence and dietary intake in The Netherlands. *Toxicology Letters*. 151, 51–61.

Bailey R.E. 2007. Pentachlorobenzene-Sources, environmental fate and risk characterization. *Euro Chlor Science Dossier*. July 2007.

Bailey R.E., van Wijk D., Thomas P.C. **2009**. Sources and prevalence of pentachlorobenzene in the environment. *Chemosphere*. 75: 555-564.

Barnosky A. D., Hadly E. A., Bascompte J., Berlow E. L., Brown J. H., Fortelius M., Getz W. M, Harte J., Hastings A., Marquet P. A., Martinez N. D., Mooers A., Roopnarine P., Vermeij G., Williams J. W., Gillespie R., Kitzes J., Marshall C., Matzke N., Mindell D. P, Revilla E., Smith A. B. **2012**. Approaching a state shift in Earth's biosphere. *Nature*. 486: 52-57.

Barrera-Díaz C.E., Lugo-Lugo V., Bilyeu B. **2012**. A review of Chemical, electrochemical and biological methods for aqueous Cr(VI) reduction. *Journal of Hazardous Materials*. 223-224: 1-12.

Baskaran, M. **2011**. Handbook of Environmental Isotope Geochemistry. *Springer*, Vol.1. ISBN 3642106366.

Basu A, Mahata J, Gupta S, Giri A. **2001**. Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 488: 171-194.

Becker L., Scheringer M., Schenker U., Hungerbühler K. **2011**. Assessment of the environmental persistence and long-range transport of endosulfan. *Environmental Pollution*. 159: 1737-1743.

Bidleman T.F., Helm P.A., Braune B. M., Gabrielsen G. W. **2010**. Polychlorinated naphthalenes in polar environments – A review. *Science of the Total Environment*. 408: 2919-2935.

Bird G. **2011**. Provenancing anthropogenic Pb within the fluvial environment: Developments and challenges in the use of Pb isotopes. *Environment International*. 37: 802-819.

Blankenship A, Kannan K, Villalobos S, Villeneuve D, Falandysz J, Imagawa T, Jakobsson E, Giesy J. **2000**. Relative potencies of individual polychlorinated naphthalenes and halowax mixtures to induce Ah receptor-mediated responses. *Environmental Science & Technology*. 34: 3153-3158.

Bocio A, Domingo JL. **2005**. Daily intake of polychlorinated dibenzo-pdioxins/polychlorinated dibenzofurans (PCDD/PCDFs) in foodstuffs consumed in Tarragona, Spain: a review of recent studies (2001-2003) on human PCDD/PCDF exposure through the diet. *Environmental Research* 97: 1-9.

BOE, Boletín Oficial del Estado. **1990**. Real Decreto 1310/1990, de 29 de octubre, por el que se regula la utilización de los lodos de depuración en el sector agrario. Spain: *Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*.

BOE. **2006**. Real Decreto 228/2006, de 24 de febrero, por el que se modifica el Real Decreto 1378/1999, de 27 de agosto, por el que se establecen medidas para la eliminación y gestión de los policlorobifenilos, policloroterfenilos y aparatos que los contengan.

Boethling, R. S. i D. Mackay. **2000**. Handbook of property estimation methods for chemicals. Environmental and Health sciences, *Lewis Publishers*, Boca Raton, FL.

Boulanger, B., Vargo, J.D., Schnoor, J.L., Hornbuckle, K.C., **2005**. Evaluation of perfluorooctane surfactants in a wastewater treatment system and in a commercial surface protection product. *Environmental Science & Technology*. 39, 5524–5530.

Boulding, R. **1995**. Practical handbook of soil, vadose zone and ground water contamination: assessment, prevention and remediation. *CRC Press, Inc.*, Florida.

Box J.D. **1983**. Investigation of Folin–Ciocalteu phenol reagent for determination of polyphenolic substances in natural waters. *Water Research*. 17:511–25.

Budavari, S. **1996**. The Merck Index - An Encyclopedia of Chemicals, Drugs, and Biologicals. Whitehouse Station, NJ: *Merck and Co., Inc.*

Bundschuh J., Nath B., Bhattacharya P., Liu C-W., Armienta M.A., Moreno López M.V., Lopez D.L., Jean J-S., Cornejo L., Macedo L.F.L., Filho A.T. **2012**. Arsenic in the human food chain: the Latin American perspective. *Science of the Total Environment*. 429: 92-106

Butt, Craig M., Derek C.G. Muir, and Scott A. Mabury. **2010**. Biotransformation of the 8:2 fluorotelomer acrylate in rainbow trout. In vivo dietary exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29: 2726-735

Carson, R. **1962**. *Silent Spring*. Boston: Houghton Mifflin Co.

CE. **1996**. Directiva 96/59/CE del consejo de 16 de septiembre de 1996 relativa a la eliminación de los policlorobifenilos y de los policloroterfenilos (PCB/PCT). Diario Oficial N° 243 de 24/09/1996. P. 0031-0035.

CE. **2006** Reglamento No 1881/2006 de la Comisión de 19 de diciembre de 2006 por el que se fija el contenido máximo de determinados contaminantes en los productos alimenticios. Diario Oficial de la Unión Europea.

CEE, **2008**. Diario Oficial de la Unión Europea. Directiva 2008/105/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 2008 relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas, por la que se modifican y derogan ulteriormente las Directivas 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE y 86/280/CEE del Consejo, y por la que se modifica la Directiva 2000/60/CE. 24.12.2008

CESE, CÉISE **2006**. Dictamen del Comité Ético y Social Europeo sobre la Propuesta de Directiva del Parlamento Europeo y del Consejo relativa a las restricciones, a la comercialización y el uso de sulfonatos de perfluorooctano.

Chander K., Dyckmans J., Joergensen R.G., Meyer B., Raubuch M. **2001**. Different sources of heavy metals and their long-term effects on soil microbial properties. *Biology and Fertility Soils*. 34: 241-247.

Colville R.N., Hurchinson E.J., Mindell J.S. Warren R.F. **2001**. The transport sector as source of air pollution. *Atmospheric Environment*. 35: 1537-1565.

Cvjetko P., Cvjetko I., Pavlica M. **2010**. Thallium toxicity in humans. *Arh Rada Toksikol*. 61: 111-119.

Davison W, Zhang H. **1994**. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature*. 367:546-8.

Doering, J., Damberg, M., Gamradt, A., Oehme, M. **1992**. Screening method based on the determination of perchlorinated aromatics for surface soil contaminated by copper slag containing high levels of polychlorinated dibenzofurans and dibenzo-p-dioxins. *Chemosphere* 25(6): 755-762.

EC, European Comision. **2008**. Environmental, economic and social impacts of the use of sewage sludge on land. Final report. Prepared by Milieu Ltd, WRc and RPA for the European Commission, DG Environment under Study Contract DG ENV.G.4/ETU/2008/0076r.

Environment Canada, **2010**. Pentachlorobenzene. Environment Canada, <http://www.ec.gc.ca/toxiques-toxics/Default.asp?lang=En&n=98E80CC6-1&xml=EB2A0719-EEC8-41CC-9A1E-D2481C44E61B>.

Extoxnet, **1998**. EXTTOXNET (Extension Toxicology Network), Pesticide Information Profiles: Endosulfan (<http://extoxnet.orst.edu/faqs/>). (*consultat el Juliol de 2012*).

Farhan S., Budiman J., Holsen T.M. **2002**. Experimental investigation of the interaction of soil air permeability and soil vapor extraction. *Journal of Environmental Engineering*. 128: 120-130.

Foght, J., April, T., Biggar, K., Aislabie, J., **2001**. Bioremediation of DDT-contaminated soils: a review. *Bioremediation Journal*. 5, 225-246.

Fromme, H., Tittlemier, S.A., Volkel, W., Wilhelm, M., Twardella, D., **2009**. Perfluorinated compounds – exposure assessment for the general population in western countries. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 212, 239–270.

Fulladosa i Tomàs, E. **2004**. Avaluació de la toxicitat de metalls pesants i arsènic en diferents models biològics. Tesis Doctoral. Universitat de Girona. 19-07-2004.

Gagnard J, Huguet C, Ryser JP .**1988**. L'Analyse du Sol et du Végétal dans la Conduite de la Fertilisation: le Contrôle de la Qualité des Fruits. *Organisation Internationale de la Lutte Biologique et Intégrée*. Paris.

Gallego S.M., Pena L.B., Barcia R.A., Azpilicueta C.E., Iannone M.F., Rosales E.P., Zawoznik M.S., Groppa M.D., Benavides M.P. **2012**. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanisms. *Environmental and Experimental Botany*. 83: 33-46.

García C, Gil F, Hernández MT, Trasar C .**2003**. Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en Suelos: Medidas de Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana. *Editorial Mundi-Prensa*, Madrid, Spain.

García-Delgado M, Rodríguez-Cruz MS, Lorenzo LF, Arienzo M, Sánchez-Martín MJ. **2007**. Seasonal and time variability of heavy metal content and of its chemical forms in sewage sludges from different wastewater treatment plants. *Science of the Total Environment*. 382:82–92.

Gautam, S.K., Suresh, S., **2007**. Studies on dechlorination of DDT (1,1,1-trichloro-2,2-bis-(4-chlorophenyl) ethane) using magnesium/palladium bimetallic system. *Journal of Hazardous Materials* 139, 146-153.

Geis S.W., Fleming K.L., Korthals E.T., Searle G., Reynolds L., Karner D.A. **2000**. Modifications to the algal growth inhibition test for use as a regulatory assay. *Environmental toxicology and chemistry*. Vol. 19, No. 1. Pàg. 36-41.

Gilbert M. **2003**. Perinatal exposure to Polychlorinated Biphenyls alters excitatory synaptic transmission and short-term plasticity in the hippocampus of the adult rat. *Neurotoxicology*. 24: 851-860.

Glynn, A., Aune, M., Nilsson, I., Darnerud, P.O., Ankarberg, E.H., Bignert, A., Nordlander, I., **2009**. Declining levels of PCB, HCB and p,p 0-DDE in adipose tissue from food producing bovines and swine in Sweden 1991–2004. *Chemosphere* 74, 1457–1462.

Goodman M, Squibb K, Youngstrom E, Anthony LG, Kenworthy L, Lipkin PH. **2010**. Using systematic reviews and meta-analyses to support regulatory decision making for neurotoxicants: lessons learned from a case study of PCBs. *Environmental Health Perspectives* 118:727–34.

Gouin T, Cousins I, Mackay D. **2004**. Comparison of two methods for obtaining degradation half-lives. *Chemosphere*. 56: 531-535.

Govarts E, Nieuwenhuijsen M, Greet Schoeters, Ferran Ballester, Bloemen K, de Boer M. **2011**. Prenatal exposure to polychlorinated biphenyls (PCB) and dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) and birth weight: a meta-analysis within 12 European birth cohorts. *Environmental Health Perspectives*. 120:162–70.

Gribble, G.W. **1994**. The Natural production of chlorinated compounds. *Environmental Science and Technology* 28: 310A–319A.

Gribble, G. W. **1996**. Naturally occurring organohalogen compounds. A comprehensive survey. *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* 68: 1–423.

Grimalt, J. O., Sunyer, J., Moreno, V., Amaral, O. C., Sala, M., Rosell, A., Anto, J. M., and Albaiges, J. **1994**. Risk excess of soft-tissue sarcoma and thyroid cancer in a community exposed to airborne organochlorinated compound mixtures with a high hexachlorobenzene content. *International Journal of Cancer*. 56, 200–203.

Guitart R. **2008**. Tòxics, verins, drogues i contaminants. Volum 1. Un recorregut per la toxicologia i el món que l'envolta. *Servei de Publicacions Universitat Autònoma de Barcelona. Manuals de la Universitat Autònoma de Barcelona*: 51. ISBN 978-84-490-2551-8.

Guitart R. i Giménez, N. **2012**. Qué es un <<tóxico>>? Una propuesta de definición. *Medicina Clinica (Barcelona)* 138:127-32.

Hanzel, C. E.; Verstraeten, S. V. **2006**. Thallium induces hydrogen peroxide generation by impairing mitochondrial function. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 216, 485-492.

Haynes W.M. **2012**. CRC Handbook of Chemistry and Physics. 92th ed. Internet Version 2012. Edit. Advisory Board. *CRC Press Inc.* Accessible at: <http://www.hbcnetbase.com/>

He M., Wang X., Wu F., Fu Z. **2012**. Antimony pollution in China. *Science of the Total Environment*. 421: 41-50.

Hippelein M. i McLachlan M.S. **1998**. Soil/Air partitioning of semivolatile organic compounds. Method development and influence of physical-chemical properties. *Environmental Science Technology* 32: 310-316.

Huckins, J.N.; Petty, J.D.; Orazio, C.E.; Lebo, J.A.; Clark, R.C.; Gibson, V.L.; Gala, W.R.; Echols, K.R. **1999**. Determination of uptake kinetics (sampling rates) by lipid-containing semipermeable membrane devices (SPMDs) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water. *Environmental Science & Technology*. 33: 3918-3923.

Huckins J.N., Booij K., Petty J.D. **2006**. Monitors of organic chemicals in the environment. Semipermeable membrane devices. Fundamentals of SPMDs, pp 29-43; published by *Springer US*. ISBN 978-0-387-35414-9.

Hughes W. **1996**. Essentials of Environmental Toxicology. The Effects of Environmental Hazardous Substances on Human Health. *Ed. Taylor & Francis*.

Hugo A., Neumann P., Schmidt K.G., Baumgartner D. **2000**. Additional load of air pollution and deposition rates caused by industrial airborne emissions. *Gefahrstoffe Reinhaltung der Luft* 60: 335-340.

IARC **1997a**. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 69 (1997) Polychlorinated Dibenzo-para-dioxins and Polychlorinated Dibenzofurans; <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol69/index.php>

IARC **1997b**. Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Man.; World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 1972-PRESENT: Geneva.; p p. V69 342.

IARC **2012a**. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Agents classified by the IARC monographs, Volumes 1-105. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>

IARC **2012b**. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 100C (2012)A Review of Human Carcinogens: Arsenic, Metals, Fibres, and Dusts <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/index.php>

Ibarluzea J, Alvarez-Pedrerol M, Guxens M, Marina LS, Basterrechea M, Lertxundi A. **2011**. Sociodemographic, reproductive and dietary predictors of organochlorine compounds levels in pregnant women in Spain. *Chemosphere*. 82: 114–20.

ISO, **2002**. Soil quality. Determination of abundance and activity of soil microflora using respiration curves. Reference number ISO 17155:2002 (E). Switzerland.

Iyaka, Y.A. **2011**. Nickel in soils: A review of its distribution and impacts. *Scientific Research and Essays* 6: 6774-6777.

Jansson, B., Asplund, L., Olsson, M., **1984**. Analysis of polychlorinated naphthalenes in environmental samples. *Chemosphere* 13, 33–41.

Josephs K, Ahlskog J, Klos K, Kumar N, Fealey R, Trenerry M, Cowl C. **2005**. Neurologic manifestations in welders with pallidal MRI T1 hyperintensity. *Neurology* 64: 2033-2039.

Kandeler E, Gerber H. **1988**. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils*. 6:68–72.

Kimbrough R. **1995**. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and human health: An update. *Critical Reviews in Toxicology*. 25: 133-163.

King J.C. **2011**. Zinc: an essential but elusive nutrient. *The American Journal of Clinical Nutrition*.94: 679S-84S.

Klamer, H.J.C., Villerius, L.A., Roelsma, J., de Maagd, P.G.-J., Opperhuizen, A., **1997**. Genotoxicity testing using the Mutatox™ assay: evaluation of benzo[a]pyrene as a positive control. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 16, 857–861.

Klein, W. **1989**. Mobility of environmental chemicals, including abiotic degradation. A: Ecotoxicology and climate. Editors, Bourdeau, P., Haines, J.A., Klein, W. i Krishna Murti, R.. *John Wiley & Sons*.

Kočí V, Mlejnek M, Kochánková L. **2003**. Toxicological evaluation of exposed SPMD membranes. *Central European Journal of Chemistry*.1:28–34.

Kohonen, T. **1984**. Self-Organizing and Associative Memory, volume 8 of Springer Series in Information Sciences. *Springer*, Berlin, Heidelberg. 3rd ed. 1989.

Kohonen, T. **2000**. Self-Organizing Maps. *Springer*, 3rd edition.

Krupiński M. i Długoński J. **2011**. Biodegradation of nonylphenols by some microorganisms. *Postepy Mikrobiologii* 50: 313-319.

Landis W.G., Sofield R.M., Yu M-H. **2011**. Introduction to Environmental toxicology. Molecular substructures to ecological landscapes. Fourth Edition. *CRC Press*, United States of America. ISBN: 978-1-4398-0410-0.

Lapworth D.J., Baran N., Stuart M.E., Ward R.S. **2012**. Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence. *Environmental Pollution* 163: 287-303

Lemesh R. **1992**. Polychlorinated biphenyls: An overview of metabolic, toxicologic and health consequences. *Veterinary and Human Toxicology*. 34: 256-260.

Lewtas J. **2007**. Air combustion emissions: characterization of causative agents and mechanisms associated with cancer, reproductive, and cardiovascular effects. *Mutation Research*. 636: 95-133.

Liem, A.K.D., Theelen, R.M.C., **1997**. Dioxins. Chemical Analysis, Exposure and Risk Assessment (Thesis), Research Institute of Toxicology (RITOX), University of Utrecht, The Netherlands; ISBN: 90-393-2012-8.

Lin Y, Gupta G, Baker J. **1995**. Photodegradation of polychlorinated biphenyl congeners using simulated sunlight and diethylamine. *Chemosphere* 31: 3323-3344.

Liu Y. i Schubert D. **1997**. Cytotoxic amyloid peptides inhibit cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction by enhancing MTT formazan exocytosis. *Journal of Neurochemistry*. 69 (6): 2285-93.

Llobet, J.M., Martí-Cid, R., Castell, V., Domingo, J.L. **2008**. Significant decreasing trend in human dietary exposure to PCDD/PCDFs and PCBs in Catalonia, Spain. *Toxicology Letters*. 178, 117-126.

Lohmann R, Jones KC. **1998**. Dioxins and furans in air and deposition: A review of levels, behaviour and processes. *Science of the Total Environment*. 219: 53-81.

Lorán S., Bayarri S., Conchello P., Herrera A. **2010**. Risk assessment of PCDD/PCDFs and indicator PCBs contamination in Spanish commercial baby food. *Food Chemical Toxicology*. 48: 145-151.

Lyman W.J., Reehl W., Rosenblatt D. **1982**. Handbook of chemical property estimation methods. *McGraw-Hill*, 1221 Avenue of the Americas, New York, NY 10020.

Mackison, F. W., R. S. Stricoff, and L. J. Partridge, Jr. **1981**. NIOSH/OSHA - Occupational Health Guidelines for Chemical Hazards. DHHS(NIOSH) Publication No. 81-123 (3 VOLS). Washington, DC: U.S. Government Printing Office, Jan.

Manickam, N., Reddy, M.K., Saini, H.S., Shanker, R., **2008**. Isolation of hexachlorocyclohexane-degrading *Sphingomonas sp.* by dehalogenase assay and characterization of genes involved in g-HCH degradation. *Journal of Applied Microbiology*.104, 952e960.

Messer A. **2010**. Mini-review: Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants as potential autism risk factors 100: 245-249.

Moskalyk R.R. i Alfantazi A.M. **2003**. Processing of vanadium: a review. *Minerals Engineering* 16: 793-805.

Mosmann T., **1983**. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application of proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*. 65: 55-63.

Nadal M, Schuhmacher M, Domingo JL. **2004**. Metal pollution of soils and vegetation in an area with petrochemical industry. *Science of the Total Environment*. 321:59-69.

Naito, W., Kamo, M., Tsushima K., i Iwasaki Y. **2010**. Exposure and risk assessment of zinc in Japanese surface waters. *Science of the Total Environment* 408: 4271-4284.

Namiesnik J, Szefer P. **2009**. Analytical Measurements in Aquatic Environments. *IWA Publishing*.

Newman, M.C. **2010**. Fundamentals of Ecotoxicology. Third Edition. *CRC Press*, United States of America. ISBN: 978-1-4200-6704-0.

Nicholson F.A., Smith S.R., Alloway B.J., Carlton-Smith C., Chambers B.J. **2003**. An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of the Total Environment* 311: 205-219.

Nisbet T.R. **2001**. The role of forest management in controlling diffuse pollution in UK forestry. *Forest Ecology and Management* 143: 215-226.

Nriagu J.O. **1989**. A global assessment of natural sources of atmospheric trace metals. *Nature* 338: 47-49.

Ocampo-DuqueW, Sierra J, Ferré-Huguet N, Schuhmacher M, Domingo JL. **2008**. Estimating the environmental impact of micro-pollutants in the low Ebro River (Spain): An approach based on screening toxicity with *Vibrio fischeri*. *Chemosphere*;72:715-21.

OECD, (Organisation for Economic Cooperation and Development). **1984**. Algal growth inhibition test. OECD guidelines for testing of chemicals 201. Paris, France.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). **2000a**. OECD Guideline for the testing of chemicals. 216. Soil Microorganisms: Nitrogen Transformation test.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development), **2000b**. OECD Guideline for the testing of chemicals. 217. Soil Microorganisms: Carbon Transformation Test.

OECD, (Organization for Economic Cooperation and Development), **2006**. Terrestrial 528 Plants Test. Seedling Emergence and Seedling Growth Test. OECD Guideline 208. 529 OECD, Paris, France.

Orozco Barrenetxea C., Pérez Serrano A., González Delgado M.N., Rodríguez Vidal F.J., Alfayete Blanco J.M. **2003**. Contaminación ambiental. Una visión desde la química. *Ed. Thomson*. ISBN: 84-9732-178-2

Ortiz R., Vega S., Gutiérrez R., Gibson R., Schettino B., Ramirez M. **2012**. Preence of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in top soils from rural terrains in Mexico City. *Bull Environ Contam Toxicol* 88: 428-432.

Padovesi-Fonseca, C. i Philomeno, M. G. **2004**. Effects of algicide (Copper Sulfate) application on short-term fluctuations of phytoplankton in Lake Paranoá, Central Brazil. *Brazilian Journal of Biology* Vol.64, nº 4, pp. 819-826.

Pal A., Yew-Hoong Gin K., Yu-Chen Lin A., Reinhard M. **2010**. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment* 408: 6062-6069.

Peter A.L.J. and Viraraghavan T. **2005**. Thallium: a review of public health and environmental concerns. *Environment International* 31: 493-501.

Pica Y., Ronco A., Díaz M.C. **2004**. Ensayo de toxicidad crónica con *Selenastrum capricornutum* (*Pseudokircheriella subcapitata*) método de enumeración celular basado en el uso de hemocitómetro Neubauer. A. G. Castillo Ed. *Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Aguas*.

POPRC, **2008**. Decision POPRC-4/5 on endosulfan fulfilling the screening criteria of the Stockholm Convention. <http://www.pops.int> POPRC-4 meeting report.

Purnomo A.S., Mori T., Kamei I., Kondo R. **2011**. Basic Studies and applications of bioremediation of DDT: A review. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65: 921-930.

Quintero, J.C., Lú-Chau, T.A., Moreira, M.T., Feijoo, G., Lema, J.M., **2007**. Bioremediation of HCH present in soil by the white-rot fungus *Bjerkandera adusta* in a slurry bath bioreactor. *International Biodeterioration and Biodegradation* 60, 319e326.

Rabouan S., Dupuis A., Cariot A., Albouy-Llaty M., Legube B., Migeot V. **2012**. Analytical chemistry and metrological issues related to nonylphenols in environmental health. *Trends in Analytical Chemistry* Vol.37.

Rahman M.A., Hasegawa H., Lim R.P. **2012**. Bioaccumulation, biotransformation and trophic transfer of arsenic in the aquatic food chain. *Environmental Research* 116: 118-135.

Rallo M., Lopez-Anton M.A., Contreras M.L., Maroto-Valer M.M. **2012**. Mercury policy and regulations for coal-fired power plants. *Environmental Science and Pollution Research* 19: 1084-1096.

Ramírez WA, Domene X, Ortiz O, Alcañiz JM. **2008**. Toxic effects of digested, composted and thermally-dried sewage sludge on three plants. *Bioresource Technology*;99: 7168–75.

Rand, G.M. **1985**. Behavior, in Fundamentals of Aquatic Toxicology, Rand, GM. And S.R. Petrocelli, Eds., *Hemisphere Publishing Corp.*, Washington, DC

Reed, L., Buchner, V., Tchounwou, P.B., **2007**. Environmental toxicology and health effects associated with hexachlorobenzene exposure. *Reviews on Environmental Health* 22, 213–243.

Repetto Jiménez M., Repetto Kuhn G. 2009. Toxicología fundamental. Cuarta edición. *Ediciones Diaz de Santos*. ISBN 9788479788988.

Ribas-Fito N, Sala M, Kogevinas M, Sunyer J. **2001**. Polychlorinated biphenyls (PCBs) and neurological development in children: a systematic review. *Journal of Epidemiology and Community Health* 55:537–46.

Rice K.C. i Herman J.S. **2012**. Acidification of Earth: An assessment across mechanisms and scales. *Applied Geochemistry* 27: 1-14.

Robles-Vargas D., Montoya-Castillo S.M., Avelar-González F.J., Jauregui-Rincón J., Rodríguez-Valadez F.J., Rico-Martínez R. **2012**. Assessment of the quality and toxicity of the discharges of a wastewater treatment plant and alternatives to improve its operation. *Journal of Environmental Science and Health-Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering* 47: 589-597.

Rodríguez-Mercado J.J. i Altamirano-Lozano M.A. **2006**. Vanadium: Pollution, metabolism and genotoxicity. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 22: 173-189.

Rotander A., van Bavel B., Rigét F., Audunsson G.A., Polder A., Gabrielsen G.W., Víkingsson G., Mikkelsen B., Dam M. 2012. Polychlorinated naphthalenes (PCNs) in sub-Arctic and Arctic marine mammals, 1986-2009. *Environmental Pollution* 164: 118-124.

Rovira, J., Mari, M., Nadal, M., Schuhmacher, M., Domingo, J.L., 2011. Use of sewage sludge as secondary fuel in a cement plant: human health risks. *Environment International*. 37, 105–111.

Safe S. 1990. Polychlorinated Biphenyls (PCBs), Dibenzo-p-Dioxins (PCDDs), Dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Critical Reviews in Toxicology*. 21: 51-88.

Safe S, Wang F, Porter W, Duan R, McDougal A. 1998. Ah receptor agonists as endocrine disruptors: Antiestrogenic activity and mechanisms. *Toxicology Letters* 102-103: 343-347.

Samiullah, Y. 1990. Prediction fo the environmental fate of chemicals. *Elsevier applied science*. Londres i Nova York.

Saña J, Moré JC, Cohí A. 1996. La Gestión de la Fertilidad de los Suelos. *Publicaciones del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación*. Madrid, Spain.

Schwartz, Mel. 2002. Tin and Alloys, Properties. *Encyclopedia of Materials, Parts and Finishes* (2nd ed.). CRC Press. ISBN: [1-56676-661-3](#).

Sharma A., Mishra M., Shukla A.K., Kumar R., Abdin M.Z., Kar Chowdhuri D. 2012. Organochlorine pesticide, endosulfan induced cellular and organismal response in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Hazardous Materials* 221-222: 275-287

Shaw M., Tibbetts I.R., Müller J.F. 2004. Monitoring PAHs in the Brisbane River and Moreton Bay, Australia, using semipermeable membrane devices and EROD activity in yellowfin bream, *Acanthopagrus australis*. *Chemosphere* 56: 237-246.

Shi, H.; Shi, X.; Liu, K. J. 2004. Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 255: 67-78.

Shon H.K., Vigneswaran S., Snyder S.A. 2006. Effluent organic matter (EfOM) in wastewater: Constituents, effects and treatment, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 36: 327-374.

Sierra, J., Martí, M., Garau, M.A., Cruañas, R., 2007. Effects of the agronomic use of olive oil mill wastewater: Field experiment. *Sci. Total Environ.* 378, 90–94.

Sinkkonen S, Paasivirta J. **2000**. Degradation half-life times of PCDDs, PCDFs and PCBs for environmental fate modeling. *Chemosphere* 40: 943-949.

Sittig, M. Handbook of Toxic and Hazardous Chemicals and Carcinogens, **2002**. 4th ed. Vol 1 A-H
Norwich, NY: *Noyes Publications*. p. 1444

Soares A., Guieysse B., Jefferson B., Cartmell E., Lester J.N. **2008**. Nonylphenol in the environment: A critical review on occurrence, fate, toxicity and treatment in wastewater. *Environment International*, vol. 34, p.1033–1049.

Sommers L.E. **1977**. Chemical composition of sewage sludges and analysis of their potential use as fertilizers. *Journal of Environmental Quality*;6:225–32.

Sprague, J.B. **1969**. Measurement of pollutant toxicity to fish. I. Bioassay methods for acute toxicity. *Water Research*., 3, 793-821.

Sternbeck, J.; Sjödin, Å.; Andréasson, K., **2002**. Metal emissions from road traffic and the influence of resuspension results from two tunnel studies. *Atmospheric Environment* 36: 4735-4744.

Tabatabai, M.A. **1982**. Soil Enzymes. Dins: Page, A.L., Miller, R.H., Keeney, D.R. (Eds.) Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. *American Society of Agronomy*, Madison, pàg. 903-947.

Takasuga T, Inoue T, Ohi E, Kumar K. **2004**. Formation of Polychlorinated Naphthalenes, Dibenzo-p-Dioxins, Dibenzofurans, Biphenyls, and Organochlorine Pesticides in Thermal Processes and Their Occurrence in Ambient Air. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46: 419-431.

Takeno N. **2005**. Atlas of Eh-pH diagrams. Intercomparison of thermodynamic databases. Geological Survey of Japan Open File Report No 419. Japan: National Institute of Advanced Industrial Science and Technology Research Center for Deep Geological Environments.

TGD, **2003**. Technical Guidance Document in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances.

Tobiszewski M. and Namieśnik J. **2012**. PAH diagnostic ratios for the identification of pollution emission sources. *Environmental Pollution* 162: 110-119.

Toscano, G.; Moret, I.; Gambaro, A.; Barbante, C.; Capodaglio, G., **2011**. Distribution and seasonal variability of trace elements in atmospheric particulate in the Venice Lagoon. *Chemosphere* 85: 1518-1524.

TOXNET, 2012. Hazardous Substances Data Bank (HSDB), accessible a: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>

Truhaut, R. 1977. Eco-Toxicology - Objectives, Principles and Perspectives. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, vol. 1, no. 2, pp. 151-173.

Turlough F. Guerin, Ivan R. Kennedy J. **1992**. Endosulfan, does not bioaccumulate in mammals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 40: 2315-2323.

Turusov, V., Rakitsky, V., Tomatis, L., **2002**. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risk. *Environmental Health Perspective* 110, 125e128.

UNEP, United Nations Environment Program. **2006**. Informe del Comité de Examen de los Contaminantes Orgánicos Persistentes sobre la labor realizada en su segunda reunión. Perfil de riesgos del sulfonato de perfluorooctano.

US EPA, **1971**. Nitrogen Nitrate (Colorimetric, Brucine). EPA Method 352.1. U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH.

US EPA. **1996a**. Ultrasonic extraction, EPA standard method 3550B. United States Environmental Protection Agency.

US EPA. **1996b**. Ecological effects test guidelines. OPPTS 850.4100 terrestrial plant toxicity. Tier I (seedling emergence). EPA 712-C-96-153. United States Environmental Protection Agency.

US EPA **1999a**. Compendium of methods for the determination of inorganic compounds in ambient air. Compendium Method IO-2.1. Sampling of ambient air for total suspended particulate matter (SPM) and PM₁₀ using high volume (HV) sampler. Center for Environmental Research Information. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH 45268; June 1999.

US EPA **1999b**. Compendium of methods for the determination of toxic organic compounds in ambient air. Second Edition. Compendium Method TO-9A. Determination of polychlorinated, polybrominated and brominated/chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in ambient air. Center for Environmental Research Information. Office of Research and Development, U.S. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH 45268; June 1999

US EPA. **2000a**. EPA method 3546: microwave extraction of VOCs and SVOCs (organophosphorus pesticides, organochlorine pesticides, chlorinated herbicides, phenoxy acid herbicides, PCBs). Cincinnati, OH, USA: Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Exposure Research Laboratory;.

US EPA. **2000b**. In <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/chromium.html>.

US EPA. **2002a**. Reregistration Eligibility for Endosulfan. Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7508C). United States Environmental Protection Agency. Report no. EPA 738-R-02-013. November 2002. http://epa.gov/oppsrrd1/REDs/endosulfan_red.pdf

US EPA. **2002b**. Polycyclic organic matter. Environmental Protection Agency, Washington, D.C. Available at: <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/polycycl.html>.

US EPA. **2002c**. Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Washington, DC. October 2002. Document No. EPA-821-R-02-012.

US EPA. **2004**. Framework for Inorganic Metals Risk Assessment (External Review Draft). EPA/630/P-04/068B .U.S. Environmental Protection Agency, Washington, D.C.

US EPA. **2006**. Freshwater Screening Benchmarks. US Environmental Protection Agency;. Available at <http://www.epa.gov/reg3hwmd/risk/eco/btag/sbv/fwsed/screenbench>.

US EPA. **2007a**. Non-confidential Production Volume Information Submitted by Companies for Chemicals Under the 1986-2002 Inventory Update Rule (IUR). Manganese (7439-96-5). Available from, as of November 14, 2007: <http://www.epa.gov/oppt/iur/tools/data/2002-vol.html>

USEPA, **2007b**; EPA method 3051A: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils and oils. Revised in february 2007

Van de Plassche, E., Schwegler, A., Rasenberg, M., Schoulten, G., **2001**. Pentachlorobenzene. *Nomination Dossier for inclusion in the Stockholm convention on persistent organic pollutants (POPs)*.

Verner MA., Bouchard M., Fritsche E., Charbonneau M., Haddad S. **2011**. In vitro neurotoxicity data in human risk assessment of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): Overview and perspectives. *Toxicology in vitro* 25: 1509-1515.

Vighi, M. i Calamari, D. **1993**. Prediction of the environmental fate of chemicals. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*. Vol. 29, n.2. 209-223.

Villaescusa I., Marti S., Matas C., Martinez M., Ribó JM. **1997**. Chromium toxicity to luminescent bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: (5) 871-874.

Walkowiak J, Wiener J, Fastabend A, Heinzow B, Kramer U, Schmidt E, Steingruber H, Wundram S, Winneke G. **2001**. Environmental exposure to polychlorinated biphenyls and quality of the home environment: effects on psychodevelopment in early childhood. *Lancet* 358: 1602-1607.

Wang, X.P., Yao, T.D., Cong, Z.Y., Yan, X.L., Kang, S.C., Zhang, Y. **2006**. Gradient distribution of persistent organic contaminants along northern slope of central Himalayas, China. *Science of the Total Environment* 372: 193-202.

Wang J., Bi Y., Pfister G., Henkelmann B., Zhu K., Schramm K-W. **2009**. Determination of PAH, PCB, and OCP in water from the Three gorges Reservoir accumulated by semipermeable membrane devices (SPMD). *Chemosphere* 75: 1119-1127.

Wang J., Feng X., Anderson C.W.N., Xing Y., Shang L. **2012**. Remediation of mercury contaminated sites. A review. *Journal of Hazardous Materials* 221-222: 1-18.

Weber J., Halsall C.J., Muir D., Teixeira C., Small J., Solomon K., Hermanson M., Hung H and Bidleman T. **2010**. Endosulfan, a global pesticide: A review of its fate in the environment and occurrence in the Arctic. *Science of the Total Environment* 408: 2966-2984.

Williams D.T, Kennedy B, LeBel G.L. **1993**. Chlorinated naphthalenes in human adipose tissue from Ontario municipalities. *Chemosphere* 27:795-806.

WHO (World Health Organization). **1997**. Environmental Health Criteria 162. Flame retardants: a general introduction. Geneva, Switzerland: International Programme on Chemical Safety.

WHO (World Health Organization), **1998**. Executive Summary: Assessment of the Health Risk of Dioxins: Reevaluation of the Tolerable Daily Intake (TDI). *WHO Consultation*, May 25-29, 1998, Geneva, Switzerland.

WHO (World Health Organization). **2006**. International Programme on Chemical Safety; Concise International Chemical Assessment Document 69 Cobalt and Inorganic Cobalt Compounds pp.1-101.

Xiao T., Yang F., Li S., Zheng B., Ning Z. **2012**. Thallium pollution in China: A geo-environmental perspective. *Science of the Total Environment* 421-422: 51-58.

Zhang X., Yang L., Li Y., Li H., Wang W., Ye B. **2012**. Impacts of lead/zinc mining and smelting on the environment and human health in China. *Environmental Monitoring and Assessment* 184: 2261-2273.

Yu J., Zheng B., Liu Y., Liu C. **2011**. Evaluation of soil loss and transportation load of adsorption N and P in Poyang lake watershed. *Shengtai Xuebao/Acta Ecologica Sinica* 31: 3980-3989.

Zhang H. **2003**. Capabilities of DGT in Water. DGT- for measurements in waters, soils and sediments. Lancaster, UK: *DGT Research Ltd*.

Zhao Y.G., Wong C.K.C., Wong M.H. **2012**. Environmental contamination, human exposure and body loadings of perfluorooctane sulfonate (PFOS), focusing on Asian countries. *Chemosphere*, (In Press)

Zucconi F, Monaco A, Forte M, deBertoldi M. **1985**. Phytotoxins during the stabilization of organic matter. In: Gasser JKR, editor. Composting of agricultural and other wastes. London: *Elsevier Applied Science Publ.*, p. 73–86.

ANNEX I

Anàlisi de compostos orgànics apolars en aigües fluvials a partir del mostreig amb SPMDs. Correlació amb el grau de toxicitat.

En aquest annex es mostren els resultats de l'anàlisi d'alguns dels compostos orgànics retinguts als dispositius de mostreig passiu SPMDs que s'instal·laren als onze rius estudiats del capítol II d'aquesta tesi. Es mostren els límits de detecció de cada analit, la concentració de cada analit i la correlació de cada contaminant amb la toxicitat obtinguda (*Vibrio fischeri*) en extractes dels mateixos SPMDs.

Taula AI-1. Compostos orgànics detectats mitjançant el mostreig amb SPMDs.

	Muga	Fluvià	Ter	Tordera	Besòs	C. Infanta	Llobregat	Foix	Francolí	Segre	Ebre
Antracè ng/L	0.28	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.26
Fluorè ng/L	nd	0.38	0.43	0.21	0.34	nd	0.79	nd	nd	nd	0.29
SUM PAHs ng/L	0.28	0.38	0.43	0.21	0.34	0.00	0.79	0.00	0.00	0.00	0.55
α -hexaclorciclohexà pg/L	0.22	0.06	0.50	nd	9.63	2.75	0.96	nd	0.14	0.42	0.54
β - hexaclorciclohexà pg/L	7.45	10.5	8.64	nd	nd	nd	8.90	nd	7.41	5.16	7.49
γ - hexaclorciclohexà pg/L	7.40	8.34	12.0	nd	nd	nd	9.44	nd	4.99	6.12	7.99
δ - hexaclorciclohexà pg/L	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SUM. HCHs pg/L	15.1	18.9	21.1	0.00	9.63	2.75	19.3	0.00	12.5	11.7	16.0
Hexaclorbenzè	4.08	4.01	62.2	nd	8.70	51.9	0.06	28.1	9.28	2.91	265
Pentaclorbenzè	nd	nd	12.4	nd	nd	14.2	nd	nd	nd	nd	36.2
Triclorbenzè	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: no detectat; nq: no quantificat. Concentracions calculades a partir de la metodologia descrita per Huckins et al., 1999.

Taula AI-1. (continuació)

	Muga	Fluvià	Ter	Tordera	Besòs	C. Infanta	Llobregat	Foix	Francolí	Segre	Ebre
ng/L											
Nonilfenol	22.4	175	120	28.4	44.3	49.2	98.1	79.7	18.0	3.06	70.2
Octilfenol NP	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NP monocarboxilat	nd	nd	nd	nd	nd	nq	nd	0.14	nd	nd	nd
NP dicarboxilat	nd	nd	nd	nq	nd	1.74	nq	nd	nq	nd	nd
NP monoetoxilat	nd	nd	nd	nd	nd	0.79	nd	nd	nd	nd	nd
NP dietoxilat	0.55	0.75	0.64	0.44	0.89	2.38	0.65	0.57	0.53	0.34	0.51
OP monocarboxilat	nd	nd	nd	nd	nd	nq	nq	nd	nd	nq	nq
OP dicarboxilat	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
SUM NP i Npetox	23.0	176	121	28.8	45.1	54.1	98.8	80.4	18.5	3.4	70.7

nd: no detectat; nq: no quantificat. Concentracions calculades a partir de la metodologia descrita per Huckins et al., 1999

Taula AI-2. Correlació de Spearman entre el TI i alguns compostos orgànics detectats mitjançant els SPMDs

	Fluorè	alfa-HCH	Pentaclorbenzè	Nonilfenol	NP dietoxilado	total NP i Npetox
TI (<i>Vibrio fischeri</i>)	,564*	,688**	,600*	,600*	,818**	,600*

* significatiu a $p < 0.05$; ** significatiu a $p < 0.01$

Taula AI-3. Límits de detecció (LOD) i límits de quantificació (LOQ) dels compostos orgànics mostrejats mitjançant els sistemes SPMD. Resultats expressats en ng/SPMD i ng/L calculat a partir de la mitjana del volum d'aigua mostrejat.

	ng/SPMD		ng/L	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Antracè	1.4	4.2	0.007	0.020
Fluorè	2.4	7.2	0.011	0.034
HCH	0.21	0.71	0.001	0.003
Tri-BDE-28	0.07	0.23	0.000	0.001
Tetra-BDE-47	0.07	0.23	0.000	0.001
Penta BDE-100	0.28	0.95	0.001	0.005
Penta-BDE-99	0.28	0.95	0.001	0.005
Hexa-BDE-154	0.28	0.95	0.001	0.005
Hexa-BDE-153	0.28	0.95	0.001	0.005
Hepta-BDE-183	0.42	1.4	0.002	0.007
Deca-BDE-209	0.42	1.4	0.002	0.007
hexaclorobenzens	0.157	0.524	0.001	0.003
nonilfenol	37.5	75	0.179	0.358
octilfenol	141	378	0.674	1.806
NP monocarboxilat	27	70.5	0.129	0.337
NP dicarboxilat	34.5	93	0.165	0.444
NP monoetoxilat	7.5	19.5	0.036	0.093
NP dietoxilat	109.5	109.5	0.523	0.523
OP monocarboxilat	6	16.5	0.029	0.079
OP dicarboxilat	27	73.5	0.129	0.351

ANNEX II

Resultats de les anàlisis d'elements potencialment tòxics dels sòls estudiats a

Montroig del Camp

En aquest annex es mostren la concentració d'elements potencialment tòxics totals (extractats amb àcid nítric concentrat) dels sòls de Montroig del Camp (Capítol IV, pàgina 141).

Taula AII-1. Concentració total d'elements potencialment tòxics del sòls de Montroig del Camp . Resultats expressats en mg/kg sòl sec. NGR: nivells genèrics de referència de l'Agència de Residus de Catalunya (ARC).

Mostra	Cd	Hg	Co	Mo	Ni	Pb	Cr	As	Cu	Zn
AB-CT	0,2157	0,0374	7,26	0,11	12,78	31,52	17,15	5,82	18,14	32,04
A-AM	0,1928	0,0395	5,42	0,15	10,69	28,89	13,33	5,70	19,85	30,51
B-AM	0,4292	0,1969	4,94	0,44	10,95	31,02	20,12	4,12	178,12	249,11
C-CT	0,2123	0,0405	5,16	0,16	12,47	23,97	12,41	5,67	61,27	39,40
C-AM	0,5295	0,3304	5,17	0,68	15,06	33,18	23,10	8,29	109,12	188,90
D-CT	0,2236	0,0209	3,37	0,07	10,47	7,81	6,93	3,34	5,21	17,48
D-AM	0,2060	0,1158	4,27	0,24	12,11	12,26	13,58	4,71	27,61	76,72
E-CT	0,1234	0,0147	4,64	0,06	5,35	22,90	13,59	3,38	17,38	49,39
E-AM	0,2536	0,0816	4,95	0,18	6,81	38,71	17,18	3,82	43,40	93,35
NGR	2,5000	2,5000	25,00	3,50	45,00	60,00	135,00	30,00	90,00	170,00