



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**METODOLOGIES D'ANÀLISI D'HIDROCARBURS
AROMÀTICS POLICÍCLICS I DERIVATS
MONOHIDROXILATS EN SÒLS**

**INFLUÈNCIA DELS METALLS PESANTS EN LA DEGRADACIÓ DELS
HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS**

ORIOI BALTRONS ROSELL

TESI DOCTORAL

Directores: Cristina Palet Ballús i Montserrat López Mesas

PROGRAMA DE DOCTORAT DE QUÍMICA

Departament de Química

Facultat de Ciències

2013

Memòria presentada per aspirar al Grau de Doctor per

Oriol Baltrons Rosell

Vist i plau dels directors

Dra. Montserrat López Mesas
Professora Agregada Interina

Dra. Cristina Palet Ballús
Professora Titular

Bellaterra (Cerdanyola del Vallès), 26 de setembre de 2013

Aquesta tesi doctoral ha estat possible gràcies a la beca PIF 403-03-1/09 i la beca de mobilitat ESTPIF2011-03, proporcionades per la Universitat Autònoma de Barcelona i el següent suport econòmic:

- ✓ Ministeri de Ciència i Innovació (MICINN), mitjançant el projecte DISMEC - CTQ2009-07432/PPQ: “Desarrollo de metodologías de especiación química directa e indirecta para la caracterización eficiente de sistemas de contaminados (aguas industriales, suelos contaminados y patrimonio monumental).”
- ✓ Ministeri d’Economia i Competitivitat (MINECO), mitjançant el projecte CHEMSYNCR0 - CTM2012-30970: “Evolución tecnológica de la especiación química. Tecnología química y del sincrotrón para la caracterización y desarrollo de sistemas medioambientales y biomateriales.”

A diferents institucions de caire científic que han donat suport a la realització d’experiments per a la conclusió d’aquesta tesi:

- ✓ Els laboratoris UMR 6014 COBRA de la *Université de Rouen - IUT d’Évreux* (França)
- ✓ El Laboratori de Control de la Contaminació Ambiental de l’Institut Tèxtil i Cooperació Industrial de Terrassa (INTEXTER)
- ✓ Els laboratoris de l’Institut de Ciència i Tecnologia Ambientals (ICTA) de la Universitat Autònoma de Barcelona
- ✓ LEITAT Technological Center de Terrassa

Centre Grup de Tècniques de Separació en Química

Unitat de Química Analítica

Departament de Química

Universitat Autònoma de Barcelona

Edifici Cn, 08193 Bellaterra



ÍNDICE GENERAL

| | |
|--|----|
| ÍNDIX GENERAL | i |
| SUMMARY | 3 |
| LLISTA DE TAULES | 7 |
| LLISTA DE FIGURES | 9 |
| ABREVIACIONS I ACRÒNIMS | 15 |
| | |
| 1. INTRODUCCIÓ | 25 |
| 1.1. LA CONTAMINACIÓ MEDIAMBIENTAL EN SÒLS | 25 |
| 1.2. HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS | 30 |
| 1.2.1. FONTS D'EMISSIÓ I CONTEXT ACTUAL | 31 |
| 1.2.2. EXPOSICIÓ I TOXICITAT | 37 |
| 1.2.3. LEGISLACIÓ VIGENT | 39 |
| 1.2.4. ANTECEDENTS | 41 |
| 1.2.5. BIODEGRADACIÓ DELS PAHs | 44 |
| 1.3. HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS MONOHIDROXILATS | 47 |
| 1.3.1. FONTS D'EMISSIÓ I CONTEXT ACTUAL | 47 |
| 1.3.2. EXPOSICIÓ I TOXICITAT | 51 |
| 1.3.3. ANTECEDENTS | 51 |
| 1.3.4. POLÍMERS IMPREMTATS MOLECULARMENT | 52 |
| 1.4. METALLS PESANTS | 57 |
| 1.4.1. FONTS D'EMISSIÓ I CONTEXT ACTUAL | 58 |
| 1.4.2. EXPOSICIÓ I TOXICITAT | 60 |
| 1.4.3. LEGISLACIÓ VIGENT | 66 |
| 1.4.4. ANTECEDENTS | 68 |
| 1.5. MESCLES DE CONTAMINANTS: PAHs i HM | 69 |
| 1.6. PRESA DE MOSTRA | 73 |
| 1.6.1. ESTRATÈGIES DE PRESA DE MOSTRA | 75 |
| 1.7. CARACTERITZACIÓ DE LES MOSTRES | 78 |
| 1.7.1. HUMITAT | 78 |
| 1.7.2. pH | 79 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 1.7.3. | CONDUCTIVITAT ELÈCTRICA..... | 79 |
| 1.7.4. | PERCENTATGE DE CARBONATS..... | 80 |
| 1.7.5. | MATÈRIA ORGÀNICA..... | 81 |
| 1.7.6. | CAPACITAT MÀXIMA DE RETENCIÓ D'AIGUA..... | 82 |
| 1.7.7. | METALLS PESANTS..... | 82 |
| 1.7.8. | DETERMINACIÓ DE LES UNITATS FORMADORES DE COLÒNIES..... | 83 |
| 1.8. | MICROCOSMOS..... | 84 |
| 1.9. | OBJECTIUS..... | 85 |
| 1.10. | BIBLIOGRAFIA..... | 87 |
| 2. | EXPERIMENTAL..... | 105 |
| 2.1. | REACTIUS I DISSOLVENTS..... | 105 |
| 2.2. | SOLUCIONS..... | 107 |
| 2.3. | MATERIALS I EQUIPS..... | 107 |
| 2.4. | MÈTODES ANALÍTICS D'EXTRACCIÓ..... | 109 |
| 2.4.1. | EXTRACCIÓ SOXHLET..... | 109 |
| 2.4.2. | EXTRACCIÓ ASSISTIDA PER MICROONES..... | 111 |
| 2.4.2.1. | EXTRACCIÓ DELS PAHs..... | 112 |
| 2.4.2.2. | EXTRACCIÓ DELS OH-PAHs..... | 113 |
| 2.5. | MÈTODES ANALÍTICS DE PURIFICACIÓ..... | 113 |
| 2.5.1. | EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA (SPE)..... | 113 |
| 2.5.1.1. | SPE C18..... | 113 |
| 2.5.1.2. | SPE AMB SÍLICE COMPACTADA..... | 115 |
| 2.5.1.3. | SPE MIPs..... | 115 |
| 2.5.2. | PURIFICACIÓ EN COLUMNA..... | 116 |
| 2.5.2.1. | COLUMNA AMB GEL DE SÍLICE..... | 116 |
| 2.5.2.2. | COLUMNA MIXTA AMB GEL DE SÍLICE I ALÚMINA..... | 117 |
| 2.6. | TÈCNiques INSTRUMENTALS D'ANÀLISI..... | 117 |
| 2.6.1. | ANALITZADOR PORTÀTIL DE FLUORESCÈNCIA DE RAJOS X (FP-XRF)..... | 117 |
| 2.6.2. | ESPECTROMETRIA DE MASSES AMB FONT DE PLASMA ACOBLAT INDUCTIVAMENT (ICP/MS)..... | 119 |
| 2.6.3. | CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ AMB DETECTOR DE FLUORESCÈNCIA (HPLC/FLD)..... | 122 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 2.6.4. | CROMATOGRAFIA DE GASOS ACOBLADA A L'ESPECTROMETRIA DE MASSES (GC/MS)..... | 123 |
| 2.6.4.1. | ANÀLISI DELS PAHs | 124 |
| 2.6.4.2. | ANÀLISI DELS OH-PAHs..... | 127 |
| 2.7. | MOSTRES ANALITZADES | 129 |
| 2.7.1. | DESCRIPCIÓ DE LES MOSTRES | 130 |
| 2.7.2. | PRETRACTAMENT I CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES | 135 |
| 2.8. | CARACTERITZACIÓ DE LES MOSTRES | 136 |
| 2.8.1. | HUMITAT | 137 |
| 2.8.2. | pH | 137 |
| 2.8.3. | CONDUCTIVITAT ELÈCTRICA..... | 137 |
| 2.8.4. | PERCENTATGE DE CARBONATS..... | 137 |
| 2.8.5. | MATÈRIA ORGÀNICA..... | 138 |
| 2.8.6. | CAPACITAT MÀXIMA DE RETENCIÓ D'AIGUA..... | 138 |
| 2.8.7. | METALLS PESANTS..... | 138 |
| 2.8.7.1. | FRACCIÓ TOTAL..... | 139 |
| 2.8.7.2. | FRACCIÓ BIODISPONIBLE..... | 139 |
| 2.8.8. | DETERMINACIÓ DE LES UNITATS FORMADORES DE COLÒNIES (CFU)..... | 139 |
| 2.9. | DOPATGE DE SÒLS | 141 |
| 2.9.1. | DOPATGE DEL SÒL D'YVETOT AMB OH-PAHs | 141 |
| 2.9.2. | DOPATGE DEL SOL DE SABADELL AMB METALLS PESANTS | 142 |
| 2.10. | MICROCOSMOS | 143 |
| 2.10.1. | MICROCOSMOS PREPARATS A PARTIR DEL SÒL D'YVETOT | 143 |
| 2.10.2. | MICROCOSMOS PREPARATS A PARTIR DEL SÒL DE SANT QUIRZE, POLINYÀ I SABADELL | 145 |
| 2.10.3. | MICROCOSMOS PREPARATS A PARTIR DEL SÒL DE SABADELL..... | 147 |
| 2.11. | BIBLIOGRAFIA..... | 148 |
| 3. | RESULTATS I DISCUSSIÓ | 153 |
| 3.1. | ANÀLISI D'HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS (PAHs) | 153 |
| 3.1.1. | TÈCNICA INSTRUMENTAL D'ANÀLISI: CROMATOGRAFIA DE GASOS ACOBLADA A L'ESPECTROMETRIA DE MASSES (GC/MS) | 154 |
| 3.1.2. | MÈTODES ANALÍTICS DE PURIFICACIÓ..... | 157 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 3.1.2.1. | SPE C18 | 157 |
| 3.1.2.2. | COLUMNA AMB GEL DE SÍLICE | 160 |
| 3.1.2.3. | SPE AMB SÍLICE COMPACTADA..... | 161 |
| 3.1.2.4. | COLUMNA MIXTA AMB GEL DE SÍLICE I ALÚMINA | 162 |
| 3.1.3. | MÈTODES ANALÍTICS D'EXTRACCIÓ..... | 165 |
| 3.1.3.1. | EXTRACCIÓ SOXHLET | 165 |
| 3.1.3.2. | EXTRACCIÓ ASSISTIDA PER MICROONES | 166 |
| 3.1.4. | EFFECTE DEL PRETRACTAMENT DE MOSTRA: TAMISAT I MÒLTA | 169 |
| 3.2. | ANÀLISI D'HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS MONOHIDROXILATS (OH-PAHs)..... | 172 |
| 3.2.1. | ANÀLISI DELS OH-PAHs | 173 |
| 3.2.1.1. | SILILACIÓ-GC/MS..... | 173 |
| 3.2.1.2. | CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ AMB DETECTOR DE FLUORESCÈNCIA (HPLC/FLD) | 175 |
| 3.2.2. | PURIFICACIÓ MITJANÇANT POLÍMERS IMPREMTATS MOLECULARMENT (MIPs): ELECCIÓ DEL VOLUM I SOLVENTS D'ELUCIÓ ÒPTIMS..... | 177 |
| 3.2.3. | EXTRACCIÓ ASSISTIDA PER MICROONES: ELECCIÓ DELS SOLVENTS I TEMPERATURA ÒPTIMS | 179 |
| 3.2.4. | COMPARACIÓ DE LA NOVA METODOLOGIA DESENVOLUPADA MAE-MIPs-HPLC/FLD AMB MAE-SILILACIÓ-GC/MS..... | 183 |
| 3.2.5. | APLICACIÓ A ESTUDIS DE BIODEGRADACIÓ | 186 |
| 3.2.5.1. | 9-HIDROXIFENANTRÈ AL MICROCOSMOS E1 | 186 |
| 3.2.5.2. | METABÒLITS HIDROXILATS AL MICROCOSMOS E2 | 188 |
| 3.3. | CHARACTERITZACIÓ DE LES MOSTRES | 190 |
| 3.4. | INFLUÈNCIA DELS METALLS PESANTS (HM) EN LA DEGRADACIÓ DELS HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS (PAHs) | 193 |
| 3.4.1. | SELECCIÓ DEL NIVELL DE DOPATGE DELS PAHs..... | 195 |
| 3.4.2. | SELECCIÓ DEL SÒL DE TREBALL | 195 |
| 3.4.3. | SELECCIÓ DEL NIVELL DE DOPATGE DELS HM | 197 |
| 3.4.3.1. | ESTUDI MICROBIOLÒGIC A DIFERENTS CONCENTRACIONS DE METALLS PESANTS | 198 |
| 3.4.4. | DEGRADACIÓ DELS PAHs EN PRESENCIA DE DIFERENTS CONCENTRACIONS DE HM ALS MICROCOSMOS | 203 |

| | |
|--|------------|
| 3.4.5. DETERMINACIÓ DE METABÒLITS HIDROXILATS COM A PRODUCTE DE DEGRADACIÓ DEL PAHs ALS MICROCOSMOS | 211 |
| 3.5. RESUM DE RESULTATS..... | 215 |
| 3.6. BIBLIOGRAFIA..... | 220 |
| 4. CONCLUSIONS GENERALS..... | 225 |
| ANNEXOS | 231 |
| ANNEX I | |
| Oriol Baltrons, Montserrat López-Mesas, Cristina Palet, Franck Le Derf, Florence Portet-Koltalo, <i>Molecularly imprinted polymers-liquid chromatography/fluorescence for the selective clean-up of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in soils</i> , Analytical Methods, 2013 (accepted). DOI: 10.1039/C3AY41227. | 233 |
| ANNEX II | |
| Oriol Baltrons, Mercè Vilaseca, Carmen Gutiérrez, Franck Le Derf, Florence Portet-Koltalo Montserrat López-Mesas, Cristina Palet, <i>Influence of different concentrations of heavy metals on PAHs biodegradation</i> (to be submitted) | 243 |
| ANNEX III | |
| <i>Exemple d'una ANOVA de la regressió lineal per la recta de calibratge del Naph.</i> | 253 |
| ANNEX IV | |
| <i>Comprovació estadística de la diferència entre mitjanes de l'estudi de l'efecte del pretractament de mostra: tamisat i mòlta.</i> | 257 |
| ANNEX IV | |
| <i>Exemple d'alguns cromatogrames obtinguts de l'anàlisi per gc/ms d'alguns microcosmos preparats per l'estudi de la influència de diferents concentracions de metalls pesants en la degradació dels PAHs.</i> | 261 |

SUMMARY

SUMMARY

Environmental pollution is nowadays a matter of serious concern among the scientific community, regulatory agencies and general public. During the last century, the high number of anthropogenic activities related to societies' development has seriously contributed in the release of multiple families of compounds to the environment which eventually can significantly alter the equilibrium of the ecosystem. The emission of pollutants in the air and their distribution in waters and soils constitute a threat for human beings health and can have a strong ecological impact in large-scale polluted areas due to their potential toxicity. Thus, there has been a considerable activity in the field of risk assessment and control of pollution, especially focused in the analysis of emerging contaminants. This has led to a dramatic increase in the development of analytical methodologies in order to determine the presence of contaminants such as heavy metals and organic compounds (e.g. polycyclic aromatic hydrocarbons) in various matrices, including soils.

On the other hand, the toxic effect of pollution is not only caused by the primary compounds released to the environment from the point of origin. When pollutants arrive to a particular media, many chemical and biological processes can take place, leading to the formation of derivate substances that can be less or more toxic than the initial compounds. In soils, biodegradation by microorganisms (e.g. bacteria, fungi) is the principal mechanism involved in such transformations and it can be affected by soil properties as well as by interactions with other present pollutants. Therefore, in recent years, there has been an increasing interest in the so called "effect of mixed pollutants" and its implication in biological processes.

In the first part of this work, a methodology for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soils has been optimized and a new methodology for the analysis of their hydroxylated metabolites (OH-PAHs) has been entirely developed and applied. For the analysis of PAHs, two extraction methods (Soxhlet and Microwave assisted extraction (MAE)), four clean-up methods involving column chromatography and solid phase extraction (SPE) based on different adsorbents and a final analysis with gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS) were tested. The results showed that MAE followed by SPE based on silica or by column chromatography based on alumina/silica and GC/MS analysis constituted a great methodology for PAHs analysis. It presented great sensitivity, low detection limits (DL) and quantification limits

(QL) and good resolution for the analysis of the selected analytes. It was also been validated by means of a certificate reference material to ensure traceability of the experimental results.

On the other hand, a new methodology was developed for the analysis of OH-PAHs, which consisted in MAE, followed by SPE based on molecularly imprinted polymers (MIPs) and the final analysis by high performance liquid chromatography coupled to fluorescence detection (HPLC/FLD). During the development of the methodology, several parameters involved in the different steps of the analysis were optimized. Different temperature and mixtures of extraction solvents were tested for MAE, the volume and nature of eluting solvents were tested for SPE MIPs and the chromatographic and detection conditions were optimized for HPLC/FLD. The new methodology was also compared with a more conventional one consisting in MAE-silylation-GC/MS as well as with other reported methodologies in the literature, showing comparable or greater sensitivity, DL, QL and reproducibility (RSD). The new methodology also presented advantages in terms of lack of interferences during the analysis as a result of the use of the highly selective clean-up by SPE MIPs, which also allowed shortening the sample pre-treatment. This was the first time that MIPs technology was applied for soil clean-up purposes for the analysis of PAHs hydroxylated metabolites.

In the second part of the work, an experiment to assess the effect of mixed pollutants was carried out. In particular, the influence of different concentrations of heavy metals on the degradation of some PAHs by soil bacterial communities was studied along 60 days. Among the scientific community, there are not many studies regarding the effect of mixed pollutants in real matrices, whereas the studies of their interaction are usually conducted for the isolated compounds (heavy metals or PAHs) and under *in vitro* conditions. To give an answer to this problem, a group of microcosms' experiments were prepared as a representation of the native environment at laboratory scale, adding mixtures of PAHs and heavy metals under controlled experimental conditions. After the analyses of such microcosms were performed, results showed that the presence of heavy metals had a significant influence on PAHs biodegradation. As a general observation, higher concentrations of heavy metals led to lower biodegradation of PAHs of 3-4 rings (Phe, Fluor and Pyr). On the other hand, no important effect on biodegradation of higher molecular weight PAHs (BbF and BaP) was observed at the different levels of heavy metals. Thus, results showed that there was a significant influence of heavy metals on PAHs biodegradation as a result of the interaction of both compounds in a complex soil matrix.

Finally, a hydroxylated metabolite of phenanthrene, 9-OHPhe, was detected and quantified in the same microcosms' experiments applying the new developed methodology previously mentioned. The results seemed to indicate that the formation mechanism of 9-OHPhe in such microcosms might not be affected by the different concentrations of heavy metals.

LLISTA DE TAULES

CAPÍTOL PRIMER. INTRODUCCIÓ

| | |
|--|----|
| Taula 1. Quantitat de PAHs ingerida per dia pels diferents grups de població a Catalunya [17] . | 34 |
| Taula 2. Contingut habitual de PAHs en sòls superficials (0-20 cm) [19]..... | 35 |
| Taula 3. Classificació segons toxicitat per la IARC dels 16 PAHs que la US EPA considera com a contaminants prioritaris [22]..... | 38 |
| Taula 4. Límits d'emissió dels PAHs en sòls segons el Real Decreto Español 9/2005 [44]..... | 40 |
| Taula 5. Taula comparativa dels diferents mètodes d'extracció de PAHs [77]..... | 42 |
| Taula 6. Classificació dels metalls pesants en diferents formes químiques [9]..... | 57 |
| Taula 7. Concentracions geoquímiques normals d'alguns metalls pesants [8,168,172,173]. | 61 |
| Taula 8. Classificació segons toxicitat per la IARC dels metalls d'estudi [181]..... | 65 |
| Taula 9. Màxims nivells de metalls pesants permesos al sòl en funció del seu ús segons la legislació vigent a Catalunya, i màxims nivells de metalls pesants permesos en sòls i llots destinats al sector agrari segons la legislació espanyola [191,192]..... | 67 |
| Taula 10. Comparació entre paràmetres bàsics de l'AAS (flama), ICP/OES i ICP/MS [207]..... | 69 |
| Taula 11. Classificació del sòl en funció de la seva acidesa [230]..... | 79 |
| Taula 12. Classificació del sòl en funció de la conductivitat elèctrica (EC) [231]..... | 80 |
| Taula 13. Classificació del sòl en funció del percentatge de carbonats [233]..... | 81 |
| Taula 14. Classificació del sòl en funció dl contingut en matèria orgànica (OM) [235]..... | 82 |

CAPÍTOL SEGON. EXPERIMENTAL

| | |
|--|-----|
| Taula 1. Possibles interferències en l'anàlisi i masses utilitzades..... | 122 |
| Taula 2. Programació de longituds d'ona en funció del temps de retenció i temps d'anàlisi dels OH-PAHs per HPLC/FLD..... | 123 |
| Taula 3. Temps de retenció i ions característics dels PAHs d'estudi..... | 126 |
| Taula 4. Temps de retenció i ions característics dels PAHs d'estudi..... | 127 |
| Taula 5. Temps de retenció i ions característics dels OH-PAHs d'estudi..... | 129 |
| Taula 6. Concentracions dels analits del CRM 115-100..... | 131 |

| | |
|---|-----|
| Taula 7. Concentracions introduïdes (mg·kg ⁻¹) dels diferents metalls pesants als sòls de Sabadell per l'estudi preliminar de creixement microbiològic..... | 142 |
|---|-----|

CAPÍTOL TERCER. RESULTATS I DISCUSSIÓ

| | |
|---|-----|
| Taula 1. Paràmetres de regressió del calibratge dels 16 PAHs mitjançant GC/MS | 156 |
| Taula 2. Comparació dels mètodes de purificació dels PAHs..... | 163 |
| Taula 3. Límits de detecció (MDL) i quantificació (MQL) del mètode MAE-SPE sílice compactada-GC/MS i MAE-columna mixta de gel de sílice i alumina-GC/MS | 169 |
| Taula 4. Concentració de PAHs després de diferents operacions de pre-tractament de mostra | 170 |
| Taula 5. Paràmetres de regressió del calibratge dels OH-PAHs mitjançant sililació-GC/MS..... | 174 |
| Taula 6. Paràmetres de regressió del calibratge dels OH-PAHs mitjançant HPLC/FLD..... | 176 |
| Taula 7. Paràmetres de regressió del calibratge i recuperacions dels OH-PAHs mitjançant MAE-MIPs-HPLC/FLD i MAE-sililació-GC/MS | 184 |
| Taula 8. Paràmetres de caracterització de les mostres | 191 |
| Taula 9. Concentració de PAHs als quatre sòls analitzats per MAE-GC/MS ^a | 192 |
| Taula 10. Concentració de metalls pesants als quatre sòls analitzats per FP-XRF ^a | 193 |
| Taula 11. Percentatge de degradació dels PAHs al cap d'un mes als diferents sòls..... | 196 |
| Taula 12. Concentració de les diferents fraccions de metalls trobades al sòl de Sabadell | 198 |
| Taula 13. Recompte de les unitats formadores de colònies (CFU) per gram de sòl dopat amb diferents concentracions de metalls..... | 201 |
| Taula 14. Concentració assolida de HM als diferents microcosmos | 202 |

LLISTA DE FIGURES

CAPÍTOL PRIMER. INTRODUCCIÓ

| | |
|---|----|
| Figura 1. Cicle biogeoquímic dels contaminants: fonts d'emissió antropogèniques, mecanismes de transport i impacte | 27 |
| Figura 2. Vista general de la contaminació per fonts antropogèniques als sòls d'Europa, a) contribució per sectors, b) contaminants més freqüents [6]..... | 28 |
| Figura 3. Comportament general dels metalls pesants i contaminants orgànics al sòl | 29 |
| Figura 4. Estructura dels 16 PAHs considerats com a contaminants prioritaris per la US EPA (abreviació)..... | 31 |
| Figura 5. Percentatge de contribució en les emissions de PAHs, per sectors, de 27 països de la Unió Europea (1990-2009) [7]..... | 32 |
| Figura 6. Percentatge de contribució dels 16 PAHs per grups d'aliments respecte la quantitat total de PAHs ingerida [7]..... | 33 |
| Figura 7. Percentatge de contribució de cadascun dels PAHs respecte la suma total dels PAHs en sòls industrials de Tarragona [18]..... | 34 |
| Figura 8. Contribució dels membres de la Unió Europea en les emissions de PAHs (Mg) l'any 2009 [16]..... | 36 |
| Figura 9. Evolució percentual de la reducció o increment de l'emissió de PAHs des del 1990 al 2009 en els països de la Unió Europea [16] | 36 |
| Figura 10. Representació de la "Regió badia" i "Regio K" a les estructures del Phe, Fluo i BaP. 37 | |
| Figura 11. Vies principals de degradació dels PAHs per fongs i bacteris [104] | 45 |
| Figura 12. Estructura d'alguns OH-PAHs estudiats a la bibliografia | 48 |
| Figura 13. Proposta de mecanisme de degradació del Flu pel consorci de bacteris dels sediments de manglar. Les fletxes sòlides indiquen una única reacció mentre que les puntejades indiquen dues o més etapes per assolir la transformació [116]..... | 49 |
| Figura 14. Proposta de mecanisme de degradació del Phe pel consorci de bacteris dels sediments de manglar. Les fletxes sòlides indiquen una única reacció mentre que les puntejades indiquen dues o més etapes per assolir la transformació [116] | 50 |
| Figura 15. Esquema general de la síntesi dels MIPs [139] | 53 |
| Figura 16. Esquema de les etapes que cal seguir per dur a terme una SPE MIPs [139]..... | 55 |

| | |
|--|----|
| Figura 17. Percentatge de reducció o increment de l'emissió de metalls (Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) des del 1990-2011 per alguns països de la Unió Europea [171] | 59 |
| Figura 18. Quantitat de metalls emesos (Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) el 2011 per alguns països de la Unió Europea (Mg) [171]..... | 60 |
| Figura 19. Percentatge de reducció o increment de l'emissió de metalls (Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) des del 1990-2011 per part d'Espanya [171]..... | 60 |
| Figura 20. Etapes fonamentals durant el procediment de presa de mostra [222]..... | 75 |
| Figura 21. Distribució de punts d'una presa de mostra aleatòria simple..... | 76 |
| Figura 22. Distribució de punts d'una presa de mostra aleatòria estratificada..... | 77 |
| Figura 23. Distribució de punts en tres estratègies diferents de presa de mostra aleatòria sistemàtica (a) quadrícula, (b) zig-zag, (c) diagonal | 77 |
| Figura 24. Distribució de punts d'una presa de mostra composta | 78 |
| Figura 25. Esquema bàsic de la preparació d'un possible microcosmos | 85 |

CAPÍTOL SEGON. EXPERIMENTAL

| | |
|---|-----|
| Figura 1. Muntatge experimental d'una extracció Soxhlet..... | 110 |
| Figura 2. Vista general del Microones Analític MARS 5..... | 111 |
| Figura 3. Parts principals d'una cel·la d'extracció de referència del microones analític..... | 112 |
| Figura 4. Etapes de purificació SPE C18..... | 115 |
| Figura 6. Analitzador portàtil de fluorescència de rajos X (FP-XRF) Alpha-6500R, d'Innov-X Systems Inc. | 118 |
| Figura 5. Vista general de l'ICP/MS Thermo Elemental XSeries 2..... | 120 |
| Figura 7. a) Cromatògraf de líquids Beckman System Gold 126 i espectrofotòmetre de fluorescència Varian ProStar, b) Espectrofotòmetre de fluorescència Cary eclipse ProStar | 123 |
| Figura 8. Cromatògraf de gasos TRACE GC ULTRA amb l'espectròmetre de masses DSQ II i l'automostrejador TRIPLUS AS de ThermoFisher Scientific | 124 |
| Figura 9. Cromatògraf de gasos, model 6850 i espectròmetre de masses, model 5975C, d'Agilent | 128 |
| Figura 10. Mapa dels municipis de la comarca del Vallès Occidental (Catalunya) on s'ha portat a terme la presa de mostra | 131 |
| Figura 11. Àrea de presa de mostra al terme municipal de Polinyà..... | 132 |
| Figura 12. Àrea de presa de mostra al terme municipal de Sabadell..... | 133 |

| | |
|---|-----|
| Figura 13. Àrea de presa de mostra al terme municipal de Sant Quirze, a l'autopista C-58..... | 133 |
| Figura 14. Àrea de presa de mostra al terme municipal de Terrassa, a l'autopista C-58..... | 134 |
| Figura 15. Àrea de presa de mostra al terme municipal d'Yvetot..... | 135 |
| Figura 16. Muntatge experimental d'un calcímetre | 138 |
| Figura 17. a) Autoclau, b) Plaques de Petri amb el medi de cultiu..... | 140 |
| Figura 18. Esquema de les etapes necessàries per dur a terme el sembrat de les plaques de Petri a partir de l'extracció dels bacteris del sòl | 141 |
| Figura 19. a) Aspecte d'alguns dels microcosmos preparats, b) Conservació dels diferents microcosmos preparats lleugerament destapats..... | 143 |
| Figura 20. Esquema de la preparació dels microcosmos E1 i E2 | 145 |
| Figura 21. Esquema de la preparació dels microcosmos a partir dels sòl de Sant Quirze, Polinyà i Sabadell..... | 146 |

CAPÍTOL TERCER. RESULTATS I DISCUSSIÓ

| | |
|--|-----|
| Figura 1. Esquema de les diferents etapes del procediment analític per l'anàlisi dels PAHs en mostres de sòls..... | 153 |
| Figura 2. Cromatograma corresponent a la separació d'una solució patró d'1,000 mg·L ⁻¹ dels 16 PAHs mitjançant GC/MS, en mode <i>Full Scan</i> , segons el mètode descrit a l'apartat 2.6.4..... | 154 |
| Figura 3. Espectre de masses de l'Anth obtingut per impacte electrònic (EI) a 70 eV, en mode <i>Full Scan</i> | 155 |
| Figura 4. Pèrdua dels PAHs durant les fases de càrrega de la mostra i recuperació a la fase d'elució amb hexà:diclorometà mitjançant SPE C18 del mètode V1. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació (n=3) | 158 |
| Figura 5. Pèrdua dels PAHs durant les fases de càrrega de la mostra i recuperació a la fase d'elució amb hexà:diclorometà mitjançant SPE C18 del mètode V2. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació (n=3) | 158 |
| Figura 6. Pèrdua dels PAHs durant les fases de càrrega de la mostra i recuperació en la fase d'elució amb hexà:diclorometà mitjançant SPE C18 del mètode V2, sense l'aplicació de buit. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació (n=3) | 159 |

Figura 7. Percentatge de recuperació dels PAHs mitjançant la purificació per cromatografia en columna amb gel de sílice com a adsorbent. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació del procediment de purificació (n=3)..... 161

Figura 8. Percentatge de recuperació del mètode de purificació mitjançant SPE amb sílice compactada. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació (n=3) 162

Figura 9. Percentatge de recuperació del mètode de purificació mitjançant la cromatografia en columna mixta amb gel de sílice i alúmina. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació (n=3)..... 163

Figura 10. Percentatges de recuperació dels mètodes de purificació SPE amb sílice compactada i columna mixta de gel de sílice i alúmina pels 16 PAHs classificats com a contaminants primaris per la US EPA. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació (n=3) 164

Figura 11. Concentració de PAHs trobada en l'anàlisi del CRM després de l'extracció Soxhlet seguida de la purificació mitjançant la columna amb gel de sílice. Pel Phe no s'indica ni el CI ni el PI donat que la seva concentració no es troba certificada al CRM..... 166

Figura 12. Concentració de PAHs trobada en l'anàlisi del CRM després del MAE, seguit de la purificació mitjançant SPE amb sílice compactada. Pel Phe no s'indica ni el CI ni el PI donat que la seva concentració no es troba certificada al CRM 167

Figura 13. Concentració de PAHs trobada en l'anàlisi del CRM després del MAE, seguit de la purificació mitjançant la columna mixta amb gel de sílice i alúmina. Pel Phe no s'indica ni el CI ni el PI donat que la seva concentració no es troba certificada al CRM 168

Figura 14. Esquema de l'estudi dissenyat per determinar la influència dels procediments de pretractament de mostra: tamisat i mòlta..... 170

Figura 15. Esquema de les dues metodologies utilitzats per l'anàlisi dels OH-PAHs 173

Figura 16. Cromatograma corresponent a l'anàlisi d'una dissolució patró d'1,000 mg·L⁻¹ dels quatre OH-PAHs silitats per GC/MS 174

Figura 17. Espectre d'emissió de fluorescència del 2-OHFlu després de fixar la longitud d'ona d'excitació a 272 nm 175

Figura 18. Cromatograma corresponent a l'anàlisi d'una dissolució de 0,020 mg·L⁻¹ dels quatre OH-PAHs per HPLC/FLD..... 177

Figura 19. Percentatge de recuperació del 2-hidroxinaftalè (2-OHNaph), 9-hidroxifenantrè (9-OHPhe) i 1-hidroxipirè (1-OHPyr) després de la purificació mitjançant SPE MIPs amb 5,00

| | |
|--|-----|
| (±0,02) mL de diferents solvents d'elució. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació (n=3)..... | 178 |
| Figura 20. Percentatge de recuperació del 2-hidroxinaftalè (2-OHNaph), 9-hidroxifenantrè (9-OHPhe) i 1-hidroxipirè (1-OHPyr) després de la purificació mitjançant SPE MIPs amb diferents volums de metanol amb un 2 % d'àcid acètic. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació (n=3)..... | 179 |
| Figura 21. Percentatge de recuperació del 2-hidroxinaftalè (2-OHNaph), 9-hidroxifenantrè (9-OHPhe) i 1-hidroxipirè (1-OHPyr) en funció de la mescla de solvents extractant utilitzat per l'extracció assistida per microones. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment d'extracció (n=3)..... | 180 |
| Figura 22. Percentatge de recuperació del 2-hidroxinaftalè (2-OHNaph), 9-hidroxifenantrè (9-OHPhe) i 1-hidroxipirè (1-OHPyr) en funció de tres temperatures (100 °C, 120 °C i 140 °C) mitjançant l'extracció assistida per microones. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment d'extracció (n=3)..... | 181 |
| Figura 23. Cromatogrames obtinguts després de l'extracció MAE del sòl dopat (PAHs + OH-PAHs) a) sense purificació de l'extracte, b) extracte purificat per MIPs (amb un factor de concentració de 4) i c) extracte percolat a través dels NIPs | 182 |
| Figura 24. Esquema de les metodologies per l'anàlisi dels OH-PAHs..... | 186 |
| Figura 25. Cromatograma del microcosmos E1 seguint la metodologia MAE-MIPs-HPLC/FLD | 187 |
| Figura 26. Cromatograma corresponent a l'anàlisi del microcosmos E1 mitjançant la metodologia MAE-sililació-GC/MS | 188 |
| Figura 27. Cromatograma corresponent a l'anàlisi del microcosmos E2 mitjançant la metodologia MAE-MIPs-HPLC/FLD | 189 |
| Figura 28. Creixements de les comunitats bacterianes extretes del sòl després del seu sembrat i incubació a diferents concentracions de metalls..... | 200 |
| Figura 29. Representació de les diferents etapes per portar a terme l'estudi de la influència de diferents concentracions de HM en la degradació dels PAHs..... | 203 |
| Figura 30. Degradació dels PAHs al llarg del temps a diferents concentracions de metalls a) Degradació Phe b) Degradació Fluo c) Degradació Pyr d) Degradació BbF e) Degradació BaP. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats de l'anàlisi de cada microcosmos (n=2) | 206 |
| Figura 31. Seguiment de l'aparició/desaparició del 9-OHPhe al llarg del temps en sòls dopats amb PAHs i a diferents concentracions de HM. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats de l'anàlisi de cada microcosmos (n=2) | 212 |

Figura 32. Cromatogrames mostrant l'aparició de 9-OHPhe com a resultat de la degradació del Phe al microcosmos dopat amb PAHs i HM (x250) al llarg de 2 mesos. El pic observat correspon a l'aparició/desaparició del 9-OHPhe 213

Figura 33. Punts d'oxidació del Fenantrè amb els percentatges de probabilitat de distribució .. 214

ABREVIACIONS I ACRÒNIMS

| | |
|-------------|--|
| ✓ 1-OHPyr | 1-hidroxipirè (1-hydroxypyrene) |
| ✓ 2-OHFlu | 2-hidroxfluorè (2-hydroxyfluorene) |
| ✓ 2-OHNaph | 2-hidroxinaftalè (2-hydroxynaphthalene) |
| ✓ 9-OHPhe | 9-hidroxifenantrè (9-hydroxyphenanthrene) |
| ✓ AAS | Espectroscòpia d'Absorció Atòmica (Atomic Absorption Spectroscopy) |
| ✓ Ace | Acenaftè (Acenaphthene) |
| ✓ Acy | Acenaftilè (Acenaphthylene) |
| ✓ Anth | Antracè (Anthracene) |
| ✓ AU | Unitats arbitràries (Arbitrary units) |
| ✓ BaA | Benzo(a)Antracè (Benzo(a)Anthracene) |
| ✓ BaP | Benzo(a)Pirè (Benzo(a)Pyrene) |
| ✓ BbF | Benzo(b)Fluorantè (Benzo(b)Fluoranthene) |
| ✓ BkF | Benzo(k)Fluorantè (Benzo(k)Fluoranthene) |
| ✓ B(g,h,i)P | Benzo(g,h,i)Perilè (Benzo(g,h,i)Perylene) |
| ✓ BSTFA | N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida, (N,O- Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide) |
| ✓ CCT-KED | Tecnologia de Cel·la de Col·lisió per Discriminació d'Energia Cinètica (Collision Cell Technology by Kinetic Energy Discrimination) |
| ✓ CFU | Unitats Formadores de Colònies (Colony Forming Units) |
| ✓ Chry | Crisè (Chrysene) |
| ✓ CI | Interval de confiança (Confidence Interval) |
| ✓ CRM | Material de Referència Certificat (Certified Reference Material) |
| ✓ DB(a,h)A | Dibenzo(a,h)Antracè (Dibenzo(a,h)Anthracene) |
| ✓ DL | Límit de Detecció (Detection Limit) |
| ✓ DOC | Carboni Orgànic Dissolt (Dissolved Organic Carbon) |
| ✓ EC | Conductivitat Elèctrica (Electrical Conductivity) |
| ✓ EEA | Agència Ambiental Europea (Environmental European Agency) |
| ✓ GC/MS | Cromatografia de Gasos acoblada a l'Espectrometria de Masses (Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry) |
| ✓ Flu | Fluorè (Fluorene) |

| | |
|-----------------|--|
| ✓ Fluo | Fluorantè (Fluoranthene) |
| ✓ FP | Paràmetres fonamentals (Fundamental Parameters) |
| ✓ FWHM | Amplada de banda a mitja alçada (Full-width at half-maximum intensity) |
| ✓ HM | Metalls Pesants (Heavy Metals) |
| ✓ HMWPAHs | Hidrocarburs Aromàtics Policíclics d'Alt Pes Molecular (High Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) |
| ✓ HPLC/FLD | Cromatografia Líquida d'alta Resolució acoblada a Detecció Fluorimètrica (High-Performance Liquid Chromatography coupled to a Fluorimetric Detector) |
| ✓ I(1,2,3-c,d)P | Indeno(1,2,3-c,d)Pirè (Indeno(1,2,3-c,d)P) |
| ✓ ICP/OES | Espectrofotometria d'Emissió Òptica amb font de Plasma Acoblat Inductivament (Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrophotometry) |
| ✓ ICP/MS | Espectrometria de Masses amb font de Plasma Acoblat Inductivament (Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) |
| ✓ ID | Diàmetre Intern (Internal Diameter) |
| ✓ LMWPAHs | Hidrocarburs Aromàtics Policíclics de Baix Pes Molecular (Low Molecular Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) |
| ✓ MAE | Extracció Assistida per Microones (Microwave Assisted Extraction) |
| ✓ MDL | Límit de Detecció del Mètode (Method Detection Limit) |
| ✓ MIPs | Polímers Impremtats Molecularment (Molecularly Imprinted Polymers) |
| ✓ MQL | Límit de Quantificació del Mètode (Method Quantification Limit) |
| ✓ MW | Pes molecular (Molecular Weight) |
| ✓ MWHC | Capacitat Màxima de Retenció d'Aigua (Maximum Water Holding Capacity) |
| ✓ Naph | Naftalè (Naphthalene) |
| ✓ NIPs | Polímers No Impremtats Molecularment (Molecularly Non-Imprinted Polymers) |
| ✓ OC | Carboni Orgànic (Organic Carbon) |
| ✓ OM | Matèria Orgànica (Organic Matter) |
| ✓ OH-PAHs | Hidrocarburs Aromàtics Policíclics Monohidroxilats (Monohydroxylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) |
| ✓ PAHs | Hidrocarburs Aromàtics Policíclics (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) |
| ✓ PFA | Perfluoroalcoxi (Perfluoroalkoxy) |

| | |
|-----------------------|--|
| ✓ PF-XRF | Equip Portàtil de Fluorescència de Rajos X (Portable Field X-Ray Fluorescence) |
| ✓ Phe | Fenantrè (Phenanthrene) |
| ✓ Phe-D ₁₀ | Fenantrè deuterat (Perdeuterated Phenanthrene) |
| ✓ PI | Interval de Predicció (Prediction Interval) |
| ✓ PVDF | Polifluorur de Vinilidè (Polyvinylidene Fluoride) |
| ✓ PTFE | Politetrafluoroetilè (Polytetrafluoroethylene) |
| ✓ Pyr | Pirè (Pyrene) |
| ✓ QL | Límit de Quantificació (Quantification Limit) |
| ✓ RSD | Desviació Estàndard Relativa (Relative Standard Deviation) |
| ✓ SD | Desviació Estàndard (Standard Deviation) |
| ✓ SIM | Selected Ion Monitoring |
| ✓ SPE | Extracció en Fase Sòlida (Solid Phase Extraction) |
| ✓ SPME | Microextracció en fase sòlida (Solid Phase Microextraction) |
| ✓ TDS | Sòlids Totals Dissolts (Total Dissolved Solids) |
| ✓ TFA | Àcid trifluoroacètic (Trifluoroacetic acid) |
| ✓ THF | Tetrahidrofurà (Tetrahydrofuran) |
| ✓ TSA | Tryptic Soy Agar |
| ✓ US EPA | Agència de Protecció Ambiental dels Estats Units (United States Environmental Protection Agency) |

“One hundred and fifty years ago, the monster began; this country had become a place of industry. Factories grew on the landscape like weeds. Trees fell, fields were up-ended, rivers blackened. The sky choked on smoke and ash, and the people did, too, spending their days coughing and itching, their eyes turned forever toward the ground. Villages grew into town, towns into cities. And people began to live on the earth rather than within it.”

Patrick Ness, *A Monster Calls*

CAPÍTOL PRIMER

INTRODUCCIÓ

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓ | 25 |
| 1.1. LA CONTAMINACIÓ MEDIAMBIENTAL EN SÒLS | 25 |
| 1.2. HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS | 30 |
| 1.2.1. FONTS D'EMISSIÓ I CONTEXT ACTUAL | 31 |
| 1.2.2. EXPOSICIÓ I TOXICITAT..... | 37 |
| 1.2.3. LEGISLACIÓ VIGENT | 39 |
| 1.2.4. ANTECEDENTS | 41 |
| 1.2.5. BIODEGRADACIÓ DELS PAHs | 44 |
| 1.3. HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS MONOHIDROXILATS | 47 |
| 1.3.1. FONTS D'EMISSIÓ I CONTEXT ACTUAL | 47 |
| 1.3.2. EXPOSICIÓ I TOXICITAT..... | 51 |
| 1.3.3. ANTECEDENTS | 51 |
| 1.3.4. POLÍMERS IMPREMTATS MOLECULARMENT..... | 52 |
| 1.4. METALLS PESANTS | 57 |
| 1.4.1. FONTS D'EMISSIÓ I CONTEXT ACTUAL | 58 |
| 1.4.2. EXPOSICIÓ I TOXICITAT..... | 60 |
| 1.4.3. LEGISLACIÓ VIGENT | 66 |
| 1.4.4. ANTECEDENTS | 68 |
| 1.5. MESCLES DE CONTAMINANTS: PAHs i HM | 69 |
| 1.6. PRESA DE MOSTRA | 73 |
| 1.6.1. ESTRATÈGIES DE PRESA DE MOSTRA..... | 75 |
| 1.7. CARACTERITZACIÓ DE LES MOSTRES | 78 |
| 1.7.1. HUMITAT..... | 78 |
| 1.7.2. pH | 79 |
| 1.7.3. CONDUCTIVITAT ELÈCTRICA..... | 79 |
| 1.7.4. PERCENTATGE DE CARBONATS | 80 |
| 1.7.5. MATÈRIA ORGÀNICA..... | 81 |
| 1.7.6. CAPACITAT MÀXIMA DE RETENCIÓ D'AIGUA..... | 82 |
| 1.7.7. METALLS PESANTS | 82 |
| 1.7.8. DETERMINACIÓ DE LES UNITATS FORMADORES DE COLÒNIES..... | 83 |
| 1.8. MICROCOSMOS | 84 |
| 1.9. OBJECTIUS | 85 |
| 1.10. BIBLIOGRAFIA | 87 |

1. INTRODUCCIÓ

1.1. LA CONTAMINACIÓ MEDIAMBIENTAL EN SÒLS

El procés d'industrialització, el desenvolupament tecnològic i el creixement econòmic de molts països del món durant el darrer segle ha causat un impacte no només a nivell social i econòmic sinó també a nivell mediambiental. Les activitats industrials i comercials, l'ús de derivats del petroli i altres tipus d'activitats antropogèniques han conduït a la generació de molts residus i l'emissió de substàncies contaminants al medi ambient, les quals són distribuïdes a través de fenòmens naturals (vent, pluges, evaporació, etc.) fins al seu destí. L'arribada de substàncies químiques a un medi natural pot suposar un risc pels ecosistemes presents (quimiodiversitat i biodiversitat), així com provocar efectes en la topografia i estabilitat del mateix. Com a resultat de les activitats contaminants ha estat necessari el naixement de noves disciplines en el camp de la ciència, tant relacionades amb la protecció del medi ambient i dels éssers vius que hi habiten, com amb la valoració del risc que suposa l'abocament d'aquestes substàncies i el desenvolupament d'estratègies de remediació dels llocs contaminats. Juntament amb aquestes disciplines científiques, ha estat necessària la creació d'una sèrie de normatives polítiques, regionals i internacionals, recollides de manera oficial a la legislació, per garantir la prevenció i el compliment del control de la contaminació. Aquestes normatives proposen una sèrie de substàncies a controlar, a causa de la seva toxicitat, i defineixen uns límits màxims d'emissió permesos, així com una sèrie de guies i protocols estandarditzats per a la valoració i gestió de la contaminació d'un territori. Totes aquestes accions no es poden dur a terme sense la col·laboració entre la ciència, tecnologia i la política [1].

El nombre de contaminants emesos al medi ambient augmenta amb el pas del temps com a resultat del desenvolupament de nous productes i les activitat diàries. Per això, el control de la contaminació ambiental implica una necessitat de monitorització dels contaminants presents als medi. Aquest fet ha desembocat en un augment del desenvolupament de tecnologies cada cop

més sofisticades per la determinació analítica de contaminants emergents a nivell traça* [2], lligada íntimament a l'evolució de la legislació, cada cop més restrictiva [3].

En particular, el sòl constitueix un medi receptor de moltes substàncies potencialment contaminants per la seva condició d'interfase entre la biosfera (biomassa terrestre, marina i ésser humà), la litosfera (escorça terrestre, sòl i sediments), la hidrosfera (aigua dolça i aigua de mar) i l'atmosfera. Tal i com es mostra a la Figura 1, els contaminants poden arribar al sòl des de l'atmosfera per fenòmens de deposició seca (deposició de partícules en suspensió a causa de la gravetat, col·lisions amb obstacles, etc.), deposició humida (gotes de pluja, neu) i poden abandonar-lo per processos de vaporització (evaporació, ebullició) [4]. També hi poden arribar per l'aplicació de pesticides (herbicides, fungicides, insecticides) o pels efluent procedents de les plantes de tractament i eliminació de residus. Una altra font de contaminació freqüent són els vessaments de substàncies procedents de magatzems i tancs de petroli, les quals poden ser arrossegades fins als sistemes aquàtics per processos de drenat [5]. Quan els contaminants arriben al sòl poden quedar-hi retinguts durant llargs períodes de temps (la qual cosa augmenta la possibilitat de ser degradats i perdre o augmentar la seva naturalesa contaminant) o ser tan mòbils que s'incorporin als demés medis i als ecosistemes presents [6]. L'arribada de compostos tòxics al sòl provoca un impacte directe sobre l'ecosistema (microorganismes, animals, vegetació) així com sobre la qualitat del terreny, la qual cosa afecta a les activitats de conreu i a la sanitat dels boscos. Aquests factors suposen, a més del contacte directe amb el sòl, una font d'exposició als contaminants per part dels humans a través de l'alimentació.

Entre tots els països de la Unió Europea, s'estima que hi ha prop de 250.000 zones que necessiten aplicar protocols de remediació de la contaminació, segons dades recents de l'*Environmental European Agency* (EEA) [7]. Aquest nombre, a més, s'espera que segueixi creixent ja que s'estima que a més de 3 milions de zones se segueixen duent a terme activitats potencialment contaminants i les previsions indiquen que, al ritme actual, el nombre de zones contaminades pot augmentar en un 50 % l'any 2025. Tot i això, cal destacar que al llarg dels darrers 30 anys, s'han aplicat protocols de remediació a més de 80.000 zones d'Europa.

* * S'utilitza la classificació "traça" per la designació d'un analit que es troba present a concentracions entre 0,001-100 ppm, i ultra-traça per un analit que es troba present a concentracions inferiors a 0,001 ppm.

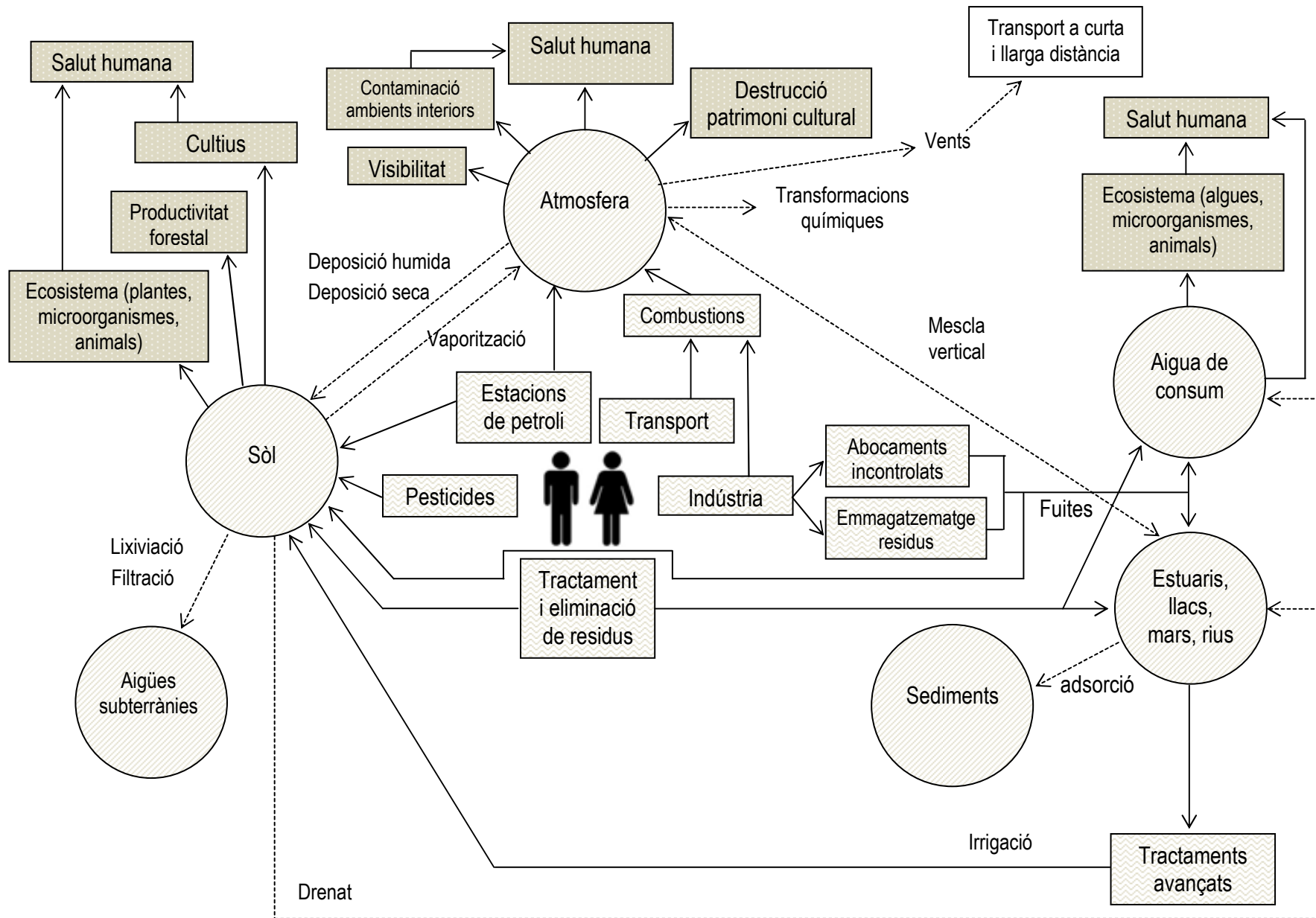


Figura 1. Ciclo biogeoquímico de los contaminantes: fuentes de emisión antropogénica, mecanismos de transporte e impacto

Tot i que el tipus d'activitat contaminant a Europa és molt variada, les grans contribucions antropogèniques provenen de les activitats industrials i comercials així com del tractament i eliminació de residus, tal i com es mostra a la Figura 2a. Per altra banda, les dades disponibles recopilades per l'EEA dels diferents països mostren que els metalls pesants, els olis minerals i els hidrocarburs aromàtics policíclics (PAHs) són els contaminants més freqüents al sòl a les zones investigades, mostrat a la Figura 2b.

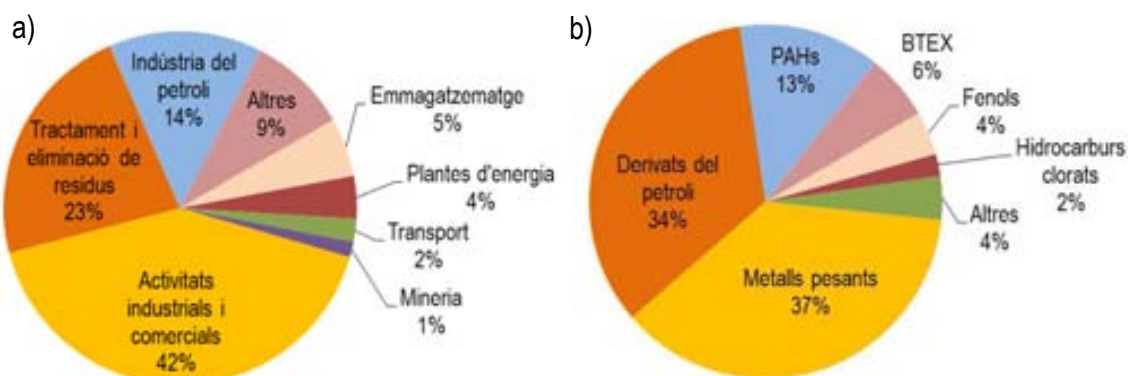


Figura 2. Vista general de la contaminació per fonts antropogèniques als sòls d'Europa, a) contribució per sectors, b) contaminants més freqüents [7]

Durant l'arribada de metalls pesants i compostos orgànics al sòl, es produeixen una gran quantitat de fenòmens fisicoquímics com per exemple reaccions d'adsorció específica als minerals del sòl i/o a la matèria orgànica present (Figura 3). Pel cas dels metalls també es poden donar reaccions de co-precipitació amb els ions presents en la dissolució del sòl, així com la formació de complexos. D'altra banda, els compostos orgànics poden ser degradats per part dels microorganismes presents al medi. Tots aquestes reaccions són altament dependents de les característiques del sòl (pH, humitat, matèria orgànica, carbonats, salinitat, etc.), les quals tenen un clar efecte en el tipus de formes químiques presents. Les diferents transformacions que pateixen els contaminants poden conduir a l'aparició d'espècies amb propietats fisicoquímiques molt diverses i, consegüentment, la seva mobilitat es pot veure incrementada o disminuïda (per exemple, per la generació d'espècies més o menys solubles) i, per tant, també la seva biodisponibilitat. Aquest augment o disminució de la biodisponibilitat pot causar un impacte important sobre els éssers vius a nivell de toxicitat, fet que remarca la importància de la valoració de l'estat del sòl i la prevenció i remediació de la contaminació de zones en risc [6,8,9].

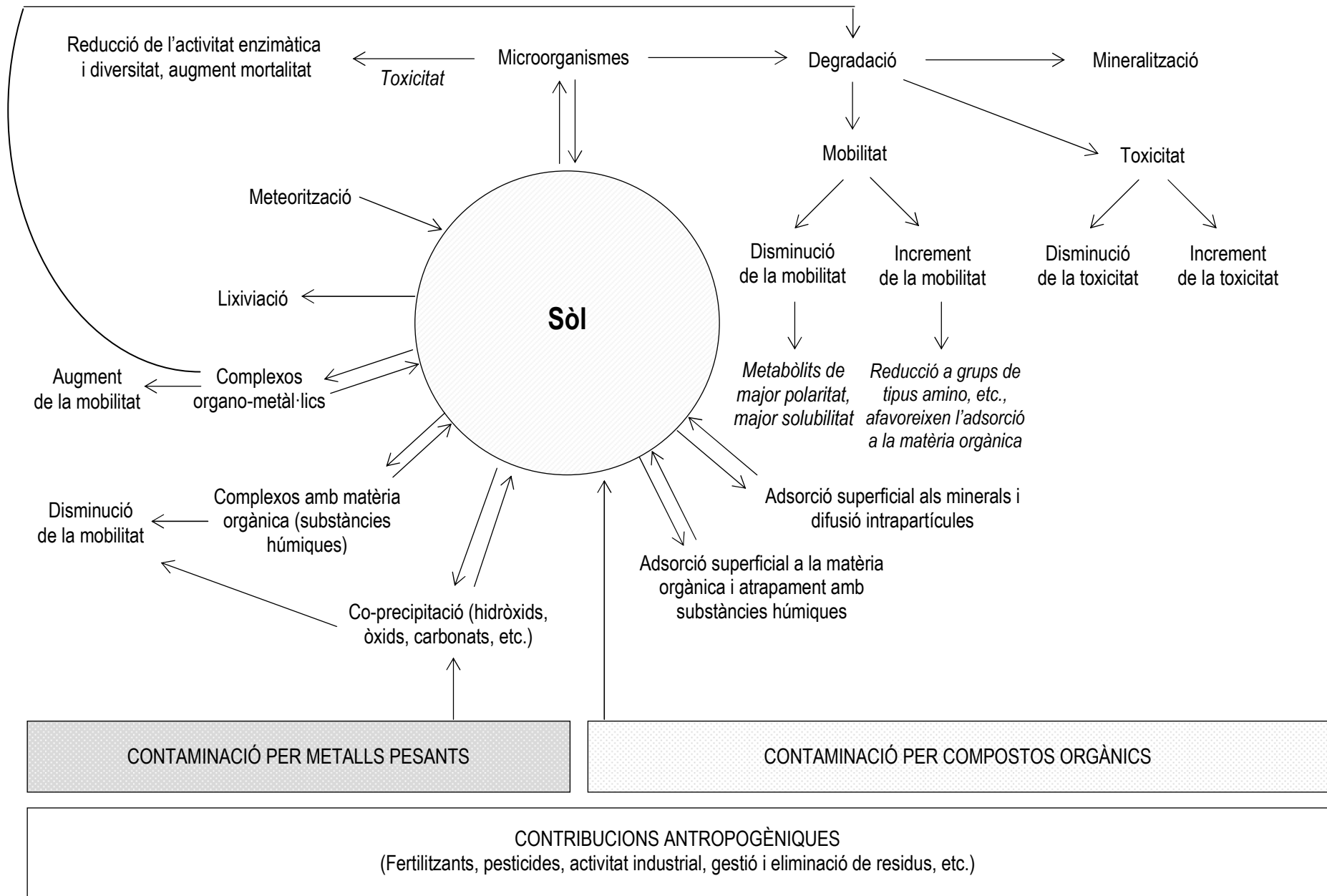


Figura 3. Comportament general dels metalls pesants i contaminants orgànics al sòl

1.2. HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS

Els Hidrocarburs Aromàtics Policíclics (PAHs) són un grup de compostos químics constituïts, principalment, per dos o més anells de benzè fusionats, contenint només carboni i hidrogen. Existeixen al medi ambient de forma natural però també poden provenir de fonts antropogèniques, alliberats com resultat de reaccions de combustió incompleta de matèria orgànica. Els PAHs engloben un ampli ventall de substàncies carcinògenes, amb potencial risc per tots els éssers vius [10].

Les diferències de configuració dels múltiples anells els confereix les propietats característiques que els diferencia als uns dels altres. Es troben presents a l'aire, l'aigua, els sòls, la flora i la fauna i la seva identificació i determinació acurades a nivell traça i ultra-traça segueix sent un important problema analític ja que, a més, no se solen trobar de forma individual sinó com a mescles d'ells. D'entre els més de 100 PAHs existents, la US EPA va identificar una llista de 16 PAHs (Figura 4) com a contaminants prioritari[†] [11] a causa dels potencials efectes que poden tenir sobre els éssers vius i el medi ambient.

Les propietats físicoquímiques dels PAHs venen determinades principalment pel sistema electrònic alfa-conjugat que posseeixen, el qual varia força regularment amb el nombre d'anells i la massa molecular. A temperatura ambient, els PAHs són sòlids i les característiques generals són alts punts de fusió i ebullició, baixa pressió de vapor i molt poca solubilitat en aigua, la qual disminueix en augmentar la massa molecular [12]. També presenten caràcter lipofílic, la qual cosa facilita la mescla amb substàncies olioses i solvents apolars [13]. Alguns dels mecanismes d'immobilització de PAHs al sòl inclouen l'adsorció superficial als minerals i la difusió intraparticular així com l'adsorció superficial a la matèria orgànica sobretot, com a resultat de la interacció amb les substàncies húmiques (com molts compostos orgànics, tal i com es mostra a l'anterior Figura 3).

Els PAHs són químicament estables i no es degraden fàcilment per hidròlisi. Quan es troben dissolts en aigua o adsorbits en partícules (per exemple, les del sòl) poden patir reaccions de fotodescomposició en estar exposats a llum ultraviolada provenint de la radiació solar i, a

[†] La US EPA utilitza el terme "contaminant prioritari" per aquells compostos químics sota regulació i per la determinació dels quals s'han desenvolupat mètodes analítics. Actualment han designat un total de 126 contaminants prioritaris.

l'atmosfera, poden reaccionar amb espècies contaminants oxidants com l'ozó, els òxids de nitrogen i el diòxid de sofre per formar derivats nitrats, àcids sulfònics, etc. [14].

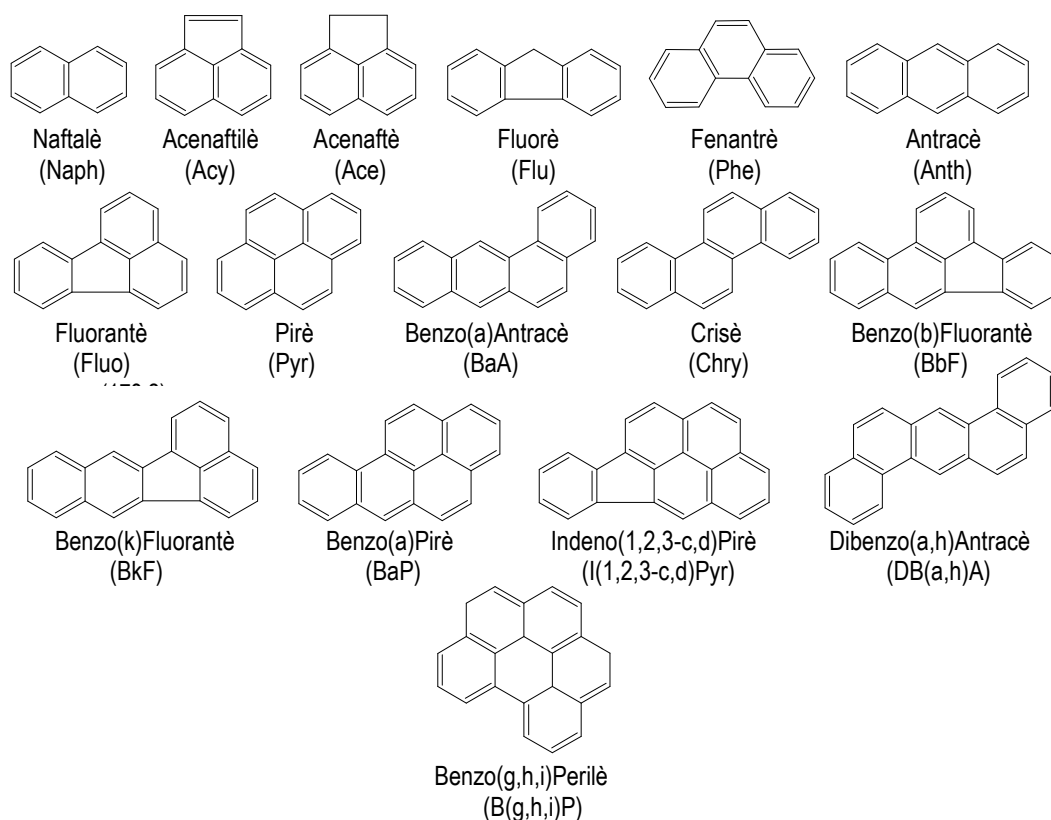


Figura 4. Estructura dels 16 PAHs considerats com a contaminants prioritaris per la US EPA (abreviació)

1.2.1. FONTS D'EMISSIÓ I CONTEXT ACTUAL

Els PAHs es formen principalment per processos de combustió incompleta de la matèria orgànica (fusta, carbó, vegetació, etc.), del petroli i dels seus derivats [26]. En aquest procés de combustió, anomenat piròlisi, els compostos orgànics reaccionen amb l'oxigen i es forma diòxid de carboni i aigua. No obstant això, quan en el procés hi ha un dèficit d'oxigen la combustió esdevé incompleta i els combustibles orgànics es descomponen a causa de les altes temperatures i pressions però no reaccionen totalment amb l'oxigen, formant-se subproductes químics tals com el monòxid de carboni i els PAHs.

Les dues fonts naturals principals d'emissió de PAHs a l'aire són les combustions naturals de la matèria orgànica tals com les erupcions volcàniques i els incendis forestals [15].

Entre les fonts d'emissió de PAHs antropogèniques més importants es troba la combustió de petrolis i, en general, els combustibles fòssils, que contenen PAHs de forma natural, encara que les concentracions solen ser baixes (al voltant de l'1%) i depenen en gran mesura de l'origen del cru. Tanmateix, representen una font molt important de producció d'aquests hidrocarburs ja que els petrolis es troben presents en els processos de piròlisi i són indispensables per la producció d'energia, per exemple, pel funcionament dels vehicles de motor, els avions i els vaixells. Altres fonts d'emissió d'aquests compostos són les activitats industrials en general, com les plantes de generació d'energia elèctrica, les incineradores de residus i també la indústria metal·lúrgica, fonamentalment la del ferro i l'alumini. El motiu principal és la utilització de productes rics en PAHs com a matèria prima en molts dels processos industrials, com són el petroli cru, el quitrà i altres combustibles fòssils, el carbó, l'hulla i els seus derivats com la creosota, la brea i alguns dissolvents comercials, que provoquen la introducció dels PAHs al medi ambient. A més, els PAHs són també utilitzats en la síntesi d'alguns medicaments i en la fabricació de tintes, plàstics i pesticides. Altres fonts de PAHs antropogèniques apareixen com a conseqüència de l'ús de calefaccions domèstiques, el consum de tabac, els aliments i la crema de carbó en barbacoes.

A la Figura 5 es mostren els percentatges de contribució de les diferents activitats de caràcter antropogènic en l'emissió de PAHs segons l'EEA, on s'inclou la recopilació d'informació al llarg de 29 anys de 27 països de la Unió Europea (segons el darrer recull de dades entre el 1990-2009 de l'*European Union Emission Inventory 1990-2009 under the UNECE Convention on Long-range Transboundary Air Pollution (LRTAP)*, emès el setembre del 2011) [16].

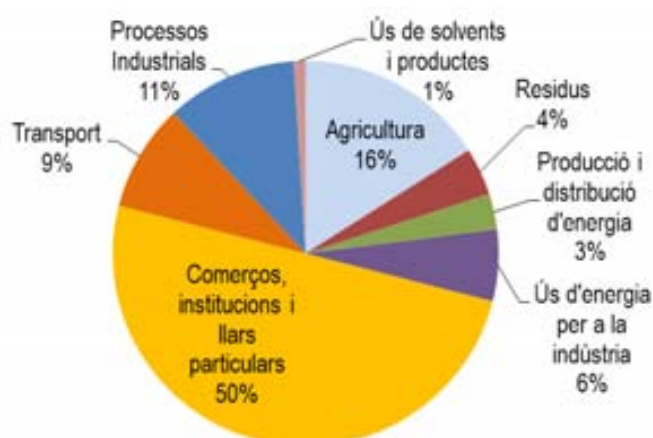


Figura 5. Percentatge de contribució en les emissions de PAHs, per sectors, de 27 països de la Unió Europea (1990-2009) [7]

Els mecanismes de transports als quals es troben subjectes les emissions de PAHs són múltiples, motiu pel qual es poden trobar en tots els medis naturals com l'aire (partícules en suspensió o dissolts en l'atmosfera), l'aigua (aigües de consum, subterrànies, llacs, rius, oceans, estuaris), i sòls (sòls d'us urbà, agrícoles, boscos, etc.). La mobilització i el transport dels PAHs en el medi ambient es veu afavorida per l'estat en què es troben aquests contaminants a temperatura ambient, ja que són substàncies amb una relativa volatilitat i tenen gran afinitat per a adsorbir-se a altres partícules, sobretot aquelles que es troben en suspensió a l'atmosfera. Això facilita que puguin ser transportats contínuament a través de l'aire per processos que involucren l'acció dels vents, forces de convecció i dispersió de les capes de l'atmosfera per l'efecte de les diferents pressions, i provoca que acabin recorrent grans distàncies des de la font emissora fins al seu destí, contaminant àmplies zones. A més, durant aquest transport poden ser transformats per múltiples processos com reaccions de tipus fotoquímic, entre d'altres. Al sòl i en aigües hi arriben per la deposició atmosfèrica, zones on pot continuar el transport i la seva degradació a altres tipus de metabòlits (per exemple, a partir dels organismes presents al medi com ara bacteris, fongs, plantes, animals, etc.). Els PAHs també es poden trobar en aliments tals com cereals, gra, pa, vegetals, fruita, que han estat conreats en zones agrícoles contaminades amb PAHs, així com en productes càrnics, lactis i peixos, com a resultat de l'exposició de les espècies animals a aquests contaminants a través de la ingestió d'aliments contaminats. Falcó *et al.* (2003) van publicar un estudi de la concentració de PAHs en menjars de la dieta de Catalunya, on mostrava que del total dels PAHs ingerits, la gran majoria provenia de les carns i els seus derivats i dels cereals (Figura 6). També va dur a terme una estadística sobre la quantitat ingerida per part dels diferents grups de població (Taula 1) [17].

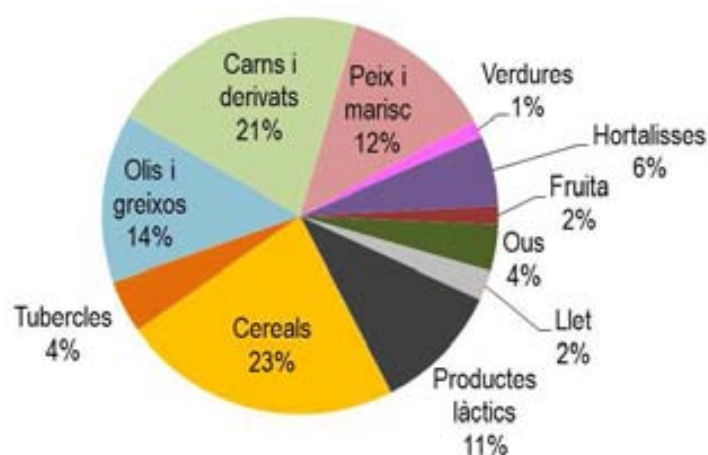


Figura 6. Percentatge de contribució dels 16 PAHs per grups d'aliments respecte la quantitat total de PAHs ingerida [7]

Taula 1. Quantitat de PAHs ingerida per dia pels diferents grups de població a Catalunya [17]

| Grups de població | Total PAH ingerit ($\mu\text{g}\cdot\text{dia}^{-1}$) |
|-------------------|---|
| Nens | 7,365 |
| Adolescents | 8,199 |
| Homes | 8,418 |
| Dones | 6,285 |
| Majors de 65 anys | 6,330 |

En sòls, la variabilitat de les dades és més heterogènia que pels aliments, ja que la concentració dels PAHs depèn del tipus d'activitat a què estigui destinat el sòl (ús urbà, agrícola o zona industrial). No obstant això, Nadal *et al.* (2004) van observar les mateixes tendències d'acumulació dels diferents PAHs per a 24 sòls recollits a diferents zones industrials al voltant de Tarragona i van comprovar que el Fluo, Pyr, BaA, Phe i BaP eren els que es trobaven en major concentració (Figura 7) [18], i Malawska i Wilkomirski (2001) van establir una classificació de l'estat de contaminació del sòl en funció de les concentracions habituals de PAHs trobades a diferents zones (Taula 2) [19].

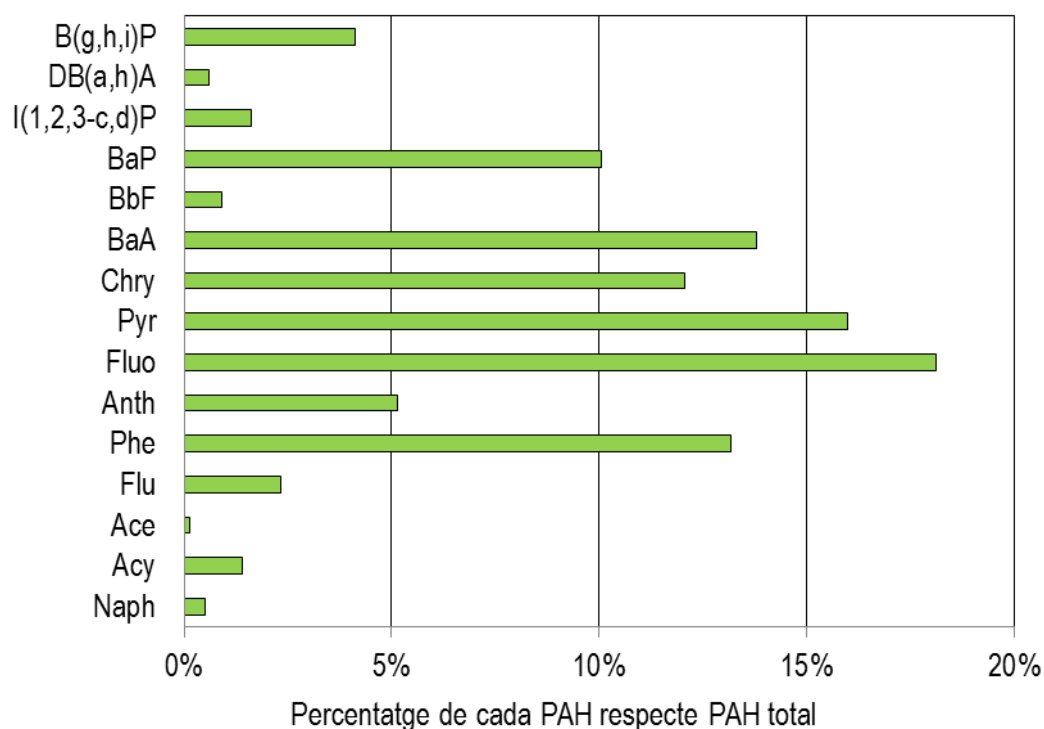


Figura 7. Percentatge de contribució de cadascun dels PAHs respecte la suma total dels PAHs en sòls industrials de Tarragona [18]

Taula 2. Contingut habitual de PAHs en sòls superficials (0-20 cm) [19]

| Contingut total de PAHs ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) | Classe de Pol·lució | Tipus de sòl |
|--|---------------------|---------------------------------------|
| < 200 | 0 | No contaminat (contingut natural) |
| 200-600 | 1 | No contaminat (contingut incrementat) |
| 600-1000 | 2 | Lleugerament contaminat |
| 1000-5000 | 3 | Contaminat |
| 5000-10000 | 4 | Fortament contaminat |
| > 10000 | 5 | Extremadament contaminat |

Així doncs, els PAHs són generats per tot tipus d'activitats antropogèniques (a més de les fonts naturals), i distribuïts per eficients mecanismes de transport a tots els medis, la qual cosa constitueix un problema ambiental que avarca tot el món. Tenen un impacte ambiental a gran escala, des de l'afectació dels éssers vius a nivell molecular fins a l'afectació de grans ecosistemes que es troben interrelacionats. Als sòls, la presència d'aquest tipus de contaminant pot tenir múltiples efectes sobre l'agricultura (reducció de la fertilitat i rendiment de les plantacions, reducció de la capacitat de fixació de nitrogen, etc.) i constitueix una amenaça per la conservació de la biodiversitat, ja que només certes poblacions i comunitats d'éssers vius són capaços d'adaptar-se i sobreviure a certs nivells d'exposició [20,21].

Segons les dades de l'EEA [16], Bèlgica i Espanya són els dos membres de la EU que més contribueixen en l'emissió dels PAHs, amb un 17 % i un 16 % del total d'emissions, respectivament, l'any 2009, tal i com s'observa a la Figura 8. De totes maneres, l'emissió de PAHs ha anat disminuint els darrers anys a la gran majoria de països de la Unió Europea, tal i com es pot observar a la Figura 9. Entre el 1990-2009, les emissions totals de PAHs van disminuir un 61 % de mitjana però des del 2008 al 2009 ho van fer només un 0,5 %. Pel cas d'Espanya, la reducció al llarg dels 29 anys ha estat del 28 % (13è país amb major reducció) i del 2008 al 2009 ho va fer en un 6,7 % (7è país amb major reducció).

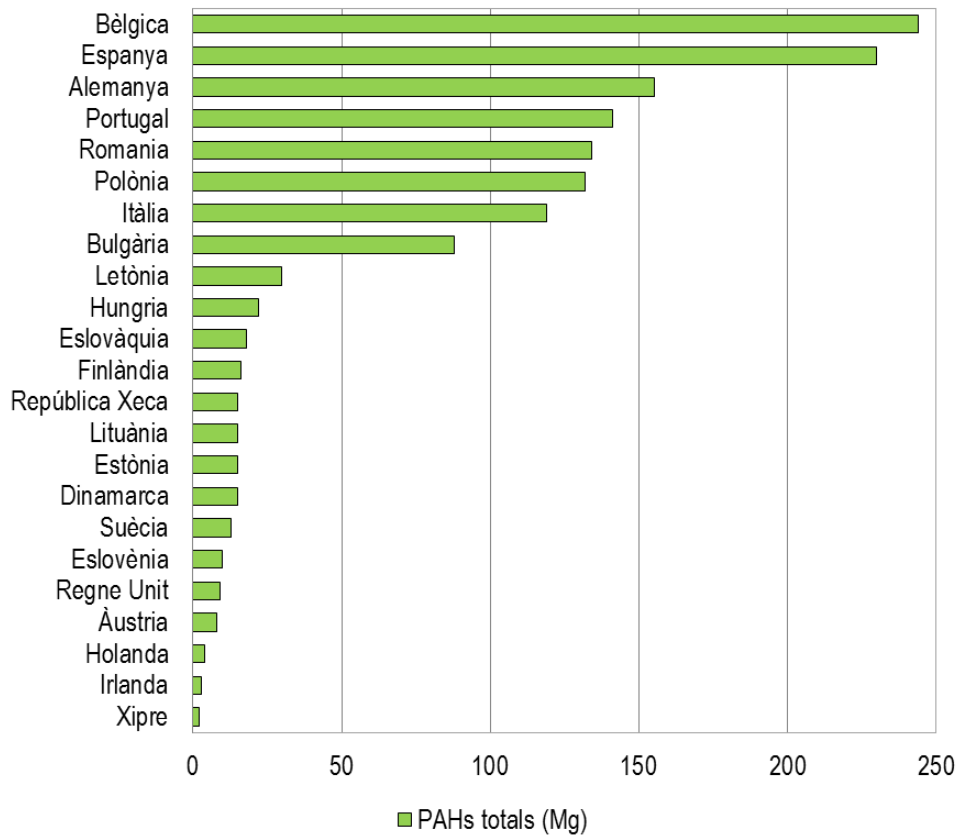


Figura 8. Contribució dels membres de la Unió Europea en les emissions de PAHs (Mg) l'any 2009 [16]

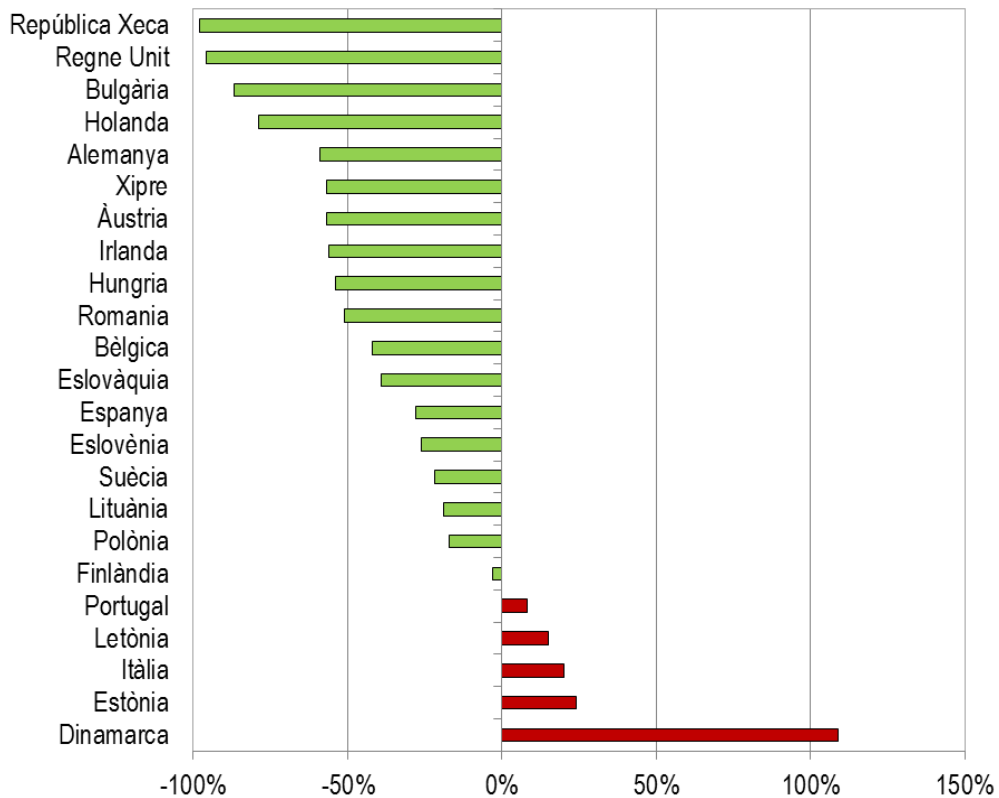


Figura 9. Evolució percentual de la reducció o increment de l'emissió de PAHs des del 1990 al 2009 en els països de la Unió Europea [16]

1.2.2. EXPOSICIÓ I TOXICITAT

Els efectes dels PAHs sobre la salut dels éssers vius s'ha estudiat intensament durant els darrers anys. Encara que la toxicitat aguda de molts PAHs sol ser baixa, són els seus efectes a mitjà i llarg termini els que fan que aquests compostos siguin objecte principal de preocupació científica i pública. La principal via d'exposició dels humans als PAHs és a través de la inhalació del fum del tabac i l'aire contaminat, les aigües, els sòls, el menjar i els productes farmacèutics [22]. L'exposició humana als PAHs s'ha associat amb un increment del risc de desenvolupament de càncer en diferents teixits (pulmons, bufeta, pell, etc.), en funció del mode d'exposició i les formes químiques en què es troben els PAHs. Les evidències de la carcinogenicitat dels PAHs provenen de l'anàlisi de poblacions amb diferents feines ocupacionals que, al llarg de la seva vida, s'han pogut trobar exposades a aquests compostos. Es va observar un major percentatge de càncer en treballadors amb feines involucrades en la producció de coc, escura-xemeneies, indústries del sutge i producció d'alumini en comparació amb d'altres tipus d'ocupacions [23].

La capacitat dels PAHs per induir tumors i produir càncers, tant en animals com en humans, és derivada de la seva genotoxicitat, és a dir, la capacitat que tenen aquestes substàncies per a produir mutacions a l'ADN. La genotoxicitat dels PAHs depèn principalment de la seva estructura química. Alguns dels hidrocarburs (per exemple, Phe, Fluo, BaP) tenen una regió en les seves molècules anomenada "Regió badia" (Figura 10), que està formada per la ramificació dels anells benzènics i que posseeix unes propietats electrofíliques molt elevades. Així, per mitjà d'aquesta regió les molècules dels PAHs poden captar electrons i modificar enllaços covalents, la qual cosa els permet interactuar amb les molècules més complexes del nostre organisme com, per exemple, l'ADN. Per altra banda, també posseeixen una altra zona, anomenada "Regió K", la qual constitueix una conformació òptima per l'ancorat de molts enzims, on es porta a terme generalment l'atac oxidatiu durant el metabolisme dels microorganismes [24].

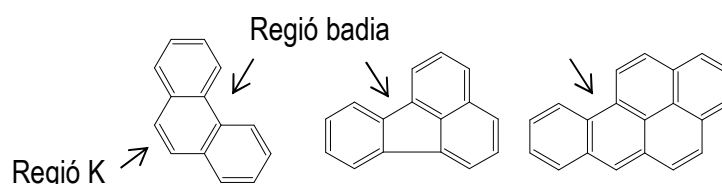


Figura 10. Representació de la "Regió badia" i "Regio K" a les estructures del Phe, Fluo i BaP

Els PAHs són metabolitzats a través de diferents reaccions enzimàtiques, com l'oxidació duta a terme pel sistema d'oxidases de funció mixta (MFO), ubicat majoritàriament al fetge, que converteix aquests compostos en epòxids. Aquestes espècies químiques resultants constitueixen la forma genotòxicament més activa dels PAHs i són les que tenen la capacitat d'adherir-se a les molècules d'ADN i induir mutacions [25]. Tot i que no existeixen estudis en humans que determinin de manera fiable l'efecte dels PAHs en la salut, en investigacions conduïdes amb animals s'ha demostrat que els PAHs poden causar càncer a la pell, als fluids corporals i al sistema immunitari després d'una exposició prolongada, sobretot quan es troben formant mesclures complexes de compostos aromàtics, alquil PAHs, benzens i alquilbenzens [8,26]. La *International Agency for Research on Cancer* (IARC) va establir una classificació dels 16 PAHs designats com a contaminants prioritars per la USEPA en diferents grups en funció de la seva carcinogenicitat (Taula 3) [22].

Taula 3. Classificació segons toxicitat per la IARC dels 16 PAHs que la US EPA considera com a contaminants prioritars [22]

| PAH | Grup* |
|-----------------------|-------|
| Naftalè | 2B |
| Acenaftilè | 3 |
| Acenaftè | 4 |
| Fluorè | 3 |
| Fenantrè | 3 |
| Antracè | 3 |
| Fluorantè | 3 |
| Pirè | 3 |
| Crisè | 3 |
| Benzo(a)Antracè | 2A |
| Benzo(k)Fluorantè | 2B |
| Benzo(b)Fluorantè | 2B |
| Benzo(a)Pirè | 2A |
| Indeno(1,2,3-c,d)Pirè | 2B |
| Dibenzo(a,h)Antracè | 2A |
| Benzo(g,h,i)Perilè | 3 |

1: Carcinogen pels humans; 2A: Probablement carcinogen pels humans; 2B: Possiblement carcinogen pels humans; 3: No classificable com a carcinogen pels humans; 4: Probablement no carcinogen pels humans.

D'entre tots els PAHs, diversos estudis han demostrat que el BaP és un dels més tòxics, motiu pel qual s'utilitza com a marcador principal per avaluar l'exposició de les poblacions als PAHs [27,28,29], i ha estat classificat com a probable carcinogen pels humans (Grup 2A) juntament amb el BaA i el DB(a,h)A.

1.2.3. LEGISLACIÓ VIGENT

Durant el darrer segle, els processos de piròlisi o de combustió de la matèria orgànica han esdevingut una activitat molt generalitzada a la indústria, fet que ha ocasionat que l'emissió de PAHs hagi augmentat sensiblement en tots els nivells del medi ambient. Per aquest motiu, tal i com s'ha comentat anteriorment, s'han establert una sèrie de paràmetres i límits legals imprescindibles per tal de tenir un control sobre aquestes substàncies, minimitzar-ne l'emissió i reduir-ne progressivament la seva emissió.

El primer document internacional d'aquest tipus va ser la *Convention on Long-range Transboundary Air Pollution* (1979) [30], ampliat per l'*Aarhus Protocol on Persistent Organic Pollutants* (1998) [31]. Aquest darrer recomanava la monitorització de 4 PAHs (BaP, BbF, BkF, i I(1,2,3-c,d)P) com a indicadors d'emissió d'aquest grup de compostos orgànics a partir de fonts estacionàries i incloïa un calendari per la reducció d'aquestes emissions fins a nivells específics. Aquest protocol va ser aprovat el 2004 i les guies de monitorització per dur a terme el seguiment de les emissions es van recollir a la *Regulation (EC) 850/2004* [32] i fou revisat el 2009 per la *Directive ECE/EB.AIR/99/Add.1* [33]. Paral·lelament al 1996 va aparèixer la *Directive 96/62/EC* [34] i la seva revisió del 2001, *Decision 2001/752/EC* [35], sobre el control de la qualitat de l'aire, en què s'establí el BaP com a marcador únic per tots els PAHs. Més endavant, totes aquestes directives es van reagrupar a la nova *Directive 2008/50/EC* [36]. Tot i que només es va fixar el control i l'especificació d'un màxim d'emissió en aire pel BaP (*Directive 2004/107/EC*) [37], es poden trobar dades del control de l'emissió d'uns altres 6 PAHs (juntament amb d'altres cinquanta contaminants) provinents de fonts estacionàries a l'*European Pollution Emission Register (EPER)* [38].

En aigües, la *Water Framework Directive 2000/60/EC* [39] establí, l'any 2000, una estratègia contra la pol·lució d'aquestes i remarcava la necessitat de controlar una sèrie de contaminants prioritaris, dins els quals es troben els PAHs. Aquesta proposta va ser escoltada i introduïda a la *Decision 2455/2001/EC* [40] pel seguiment d'aigües superficials, subterrànies i marines, pel

control del BaP, BbF, BkF, I(1,2,3-c,d)P i B(g,h,i)P. En aigües de consum es van fixar uns màxims europeus a la *Directive 98/83/EC* [41] i en menjars a la *Regulation (EC) 1881/2006* [42], modificada en quatre ocasions entre 2007-2011. També es va formalitzar la descripció dels mètodes de presa de mostra i anàlisi de BaP en menjar, recollits a la *Regulation (EC) 333/2007* [43].

A nivell de sòls, el control del terreny d'un país s'entén com una responsabilitat a nivell regional i, per tant, la legislació queda fixada pel país en qüestió. A Espanya, la legislació sobre els sòls, va quedar establerta amb la publicació del *Real Decreto Español 9/2005* [44], a través del qual es fixaven els límits d'emissió dels PAHs al sòl (Taula 4) i la *Ley 22/2011* sobre el control de residus i sòls contaminats [45].

Taula 4. Límits d'emissió dels PAHs en sòls segons el *Real Decreto Español 9/2005* [44]

| PAH | Límits d'emissió <i>Real Decreto Español 9/2005</i> (mg·kg ⁻¹ pes sec) |
|-----------------------|--|
| Naftalè | 1 |
| Acenaftilè | No especificat |
| Acenaftè | 6 |
| Fluorè | 5 |
| Fenantrè | No especificat |
| Antracè | 45 |
| Fluorantè | 8 |
| Pirè | 6 |
| Crisè | 20 |
| Benzo(a)Antracè | 0,2 |
| Benzo(k)Fluorantè | 2 |
| Benzo(b)Fluorantè | 0,2 |
| Benzo(a)Pirè | 0,02 |
| Indeno(1,2,3-c,d)Pirè | 0,3 |
| Dibenz(a,h)Antracè | 0,03 |
| Benzo(g,h,i)Perilè | No especificat |

1.2.4. ANTECEDENTS

Les primeres publicacions sobre PAHs van ser realitzades per Percival Pott el 1775, basades en estudis dels productes de combustió del sutge. La primera identificació d'un carcinogen específic va ser realitzada per Kennaway i Hieger el 1930, identificant el dibenzo(a,h)Antracè com el primer compost químic amb activitat carcinògena reconeguda [12]. A partir d'aquestes primeres identificacions, es continuà realitzant una gran quantitat d'estudis sobre la determinació de la presència d'aquests compostos en matrius més o menys complexes, com l'aigua (residuals, superficials, subterrànies, de consum [46,47,48]), l'aire (exterior, interior i interior amb presència de fum del tabac) [49,50,51], sòls i sediments (zones rurals, urbanes, amb vessaments de substàncies olives i fuels, sediments rius i llacs) [52,53,54,55], menjar i begudes [56,57,58,59], mostres biològiques (plasma, sang) [60,61], etc.

Pel cas d'interès, els PAHs en mostres de sòls s'han extret tradicionalment de la matriu mitjançant l'extracció Soxhlet [62,63,64], utilitzant gran varietat de solvents orgànics com ara el diclorometà, l'acetona, l'hexà, el toluè, etc. L'inconvenient principal és que requereix grans volums de solvent (150-400 mL) i llargs períodes de temps (8-24 hores) i, a més, de vegades, no s'aconsegueix la recuperació completa de tots els PAHs, sobretot dels de pes molecular més elevat. Per aquest motiu, hi ha d'altres mètodes que també s'utilitzen per tal finalitat i s'han realitzat multitud d'estudis comparatius entre diferents tipus d'extraccions, com ara l'extracció mitjançant ultrasons [65,66,67], l'extracció amb líquid pressuritzat (PLE) [68,69,70], l'extracció amb fluids supercrítics (SFE) [71,72,73] i l'extracció assistida per microones (MAE) [74,75,76]. Aquests mètodes redueixen el temps d'extracció, la quantitat de solvent a emprar i han demostrat ser, en molts casos, més eficients en termes de recuperació dels analits d'interès de la matriu original. A la Taula 5 es mostra una comparació entre els diferents mètodes d'extracció mencionats en termes de temps d'extracció, tipus i consum de solvents, cost d'equipament i d'altres paràmetres a tenir en compte per seleccionar el mètode més adequat per a l'extracció dels PAHs [77]. L'extracció en fase sòlida (SPE), també s'ha aplicat com a mètode d'extracció directa i ràpida dels PAHs de mostres de sòls, així com la seva variant microextracció en fase sòlida (SPME) [78], en què l'extracció es dona mitjançant l'adsorció dels PAHs a una microfibra recoberta de la fase extractant [79]. També s'ha utilitzat la desorció tèrmica acoblada a la cromatografia de gasos [80,81], en què no s'utilitzen ni solvents ni equips a altes pressions. En aquest cas, la mostra sòlida és introduïda directament al port d'injecció i escalfada ràpidament per evaporar els compostos més volàtils abans de ser arrossegats a l'inici de la columna del

Taula 5. Taula comparativa dels diferents mètodes d'extracció de PAHs [77]

| | Soxhlet | Agitació mecànica | Ultrasons | SFE | MAE | PLE |
|--------------------------------|---|---|---|-----------------------------|---|---|
| Pes mostra (g) | 10 | 1-10 | 2-30 | 1-10 | 2-5 | Fins 30 |
| Temps d'extracció | 6-24 h | 3 x 5 min | 3 x 3 min | 30 min-1 h | 20-30 min (+30 min refredament i despressurització) | 12 min |
| Tipus de solvent | acetona:hexà (1:1), acetona:DCM (1:1), DCM sol, toluè:metanol (10:1) | acetona:DCM (1:1), DCM sol | acetona:DCM (1:1), DCM sol, hexà sol | CO ₂ supercrític | acetona:hexà (1:1), acetona:toluè (1:1), (el solvent ha d'absorbir l'energia de les microones) | acetona:hexà (1:1), acetona:DCM (1:1), |
| Consum solvent (mL) | 150-400 | 10 x 3 | 100 x 3 (per 30 g) | 10-20 | 20-50 | 25 |
| Mètode d'extracció | Calor | Agitació | Agitació per ultrasons | Calor i Pressió | Calor i Pressió | Calor i Pressió |
| Simultani o seqüencial | Seqüencial (però múltiples muntatges poden operar simultàniament) | Seqüencial (però múltiples muntatges poden operar simultàniament) | Seqüencial | Seqüencial | Simultani (fins a 14 vasos poden operar alhora) | Seqüencial |
| Habilitat de l'operador | Baixa | Baixa | Moderada | Alta | Moderada | Alta |
| Cost equipament | Baix | Baix | Baix | Alt | Moderat | Alt |
| Nivell automatització | Mínim | Mínim | Mínim | Mínim a Alt | Mínim | Alt |
| Mètode US EPA | 3540 | - | 3550 | 3561 | 3546 | 3545 |

cromatògraf de gasos mitjançant el flux de gas portador. Altres mètodes d'extracció menys populars són la piròlisi [82] i l'extracció en lliu fluiditzat [83].

Com que sovint les mostres ambientals solen contenir interferents i tan sols traces dels PAHs, cal avaluar la necessitat d'utilització de mètodes de purificació després de l'etapa d'extracció i abans de l'anàlisi cromatogràfica. Entre els mètodes tradicionals de purificació dels PAHs es troben la cromatografia en columna utilitzant alúmina, gel de sílice [84,85] o Florisil® [86] com a adsorbents i també s'empra l'extracció en fase sòlida (SPE) amb fase C8, C18 i sílice compactada [87,88,89].

Finalment, la forma més habitual per a l'anàlisi dels PAHs inclou tècniques instrumentals com la cromatografia de gasos amb detecció d'ionització de flama (GC/FID) [72,84], així com l'acoblament amb l'espectrometria de masses (GC/MS) [69,73,70], la cromatografia de líquids amb detecció de fluorescència (HPLC/FLD) [67,76,87] o ultraviolada (HPLC/UV) [88,90], etc. Des dels inicis del coneixement de l'existència dels PAHs, els mètodes per l'anàlisi d'aquests compostos s'ha trobat en continu desenvolupament i optimització i han estat aplicats, durant els darrers anys, a dues línies de recerca, principalment. Per una banda, s'han centrat en la quantificació dels PAHs a diferents medis amb l'objectiu d'avaluar el grau de contaminació a la qual els éssers vius ens trobem exposats, de valorar els riscos que això comporta i de controlar el compliment de la normativa vigent de contaminació ambiental [52,54,91,92]. Per altra banda, l'altre gran camp d'interès ha estat l'estudi de la capacitat de diferents espècies d'éssers vius per degradar els PAHs, amb un clar enfoc a potencials funcions de bioremediació [93,94,95,96]. A més, aquest últim camp ha despertat noves línies d'investigació amb relació als derivats dels PAHs com a resultat de la seva biodegradació, com és el cas dels derivats oxigenats, entre els quals es troben els hidrocarburs aromàtics policíclics monohidroxilats (OH-PAHs). Aquest fet ha creat noves tendències de recerca centrades en el desenvolupament de mètodes més sofisticats de determinació d'aquests derivats, per tal de poder dur a terme determinacions a nivell traça i ultra-traça [97,98]. A més, l'interès per aquest nou conjunt de contaminants ha suposat un nou repte per la legislació existent i els organismes responsables relacionats amb la protecció del medi ambient i la salut humana, ja que s'ha vist que molts dels derivats dels PAHs constitueixen, generalment, fonts de toxicitat més elevades que els compostos de partida. Això obliga a les competències polítiques encarregades de l'establiment de mesures de protecció del medi ambient i la salut dels éssers vius a treballar conjuntament amb els organismes dedicats a la

investigació per replantejar-se la nova situació actual amb la designació d'un nou ventall de contaminants emergents. Aquests hauran de ser estudiats amb profunditat i caldrà realitzar, si s'escau, modificacions i/o esmenes de la legislació vigent per tal d'assegurar que es compleixen els requisits per prevenir, preservar i disminuir l'impacte causat sobre el medi ambient com a resultat de la contaminació per activitats antropogèniques.

1.2.5. BIODEGRADACIÓ DELS PAHs

Tal i com s'ha comentat anteriorment, els PAHs poden patir reaccions d'adsorció, fotooxidació, volatilització i degradació química. Tanmateix, està demostrat que la biodegradació, és a dir, la degradació per part dels microorganismes presents al medi d'estudi, és la principal via d'eliminació d'aquests components [99]. Els PAHs són biodegradats a metabòlits menys complexos fins a substàncies com l'aigua, el diòxid de carboni (per via aeròbica) o el metà (per via anaeròbica). La degradació dels PAHs per part dels microorganismes és un procés dependent de les condicions mediambientals (pH, temperatura, oxigen), el nombre i tipus de microorganismes (per tant, del tipus de població microbiana i del seu grau d'adaptació), de l'accessibilitat als nutrients (propietats del transport cel·lular, biodisponibilitat dels PAHs en el medi de creixement i la interacció entre ells) i la naturalesa i estructura química del compost en qüestió, entre d'altres [100]. Hi ha diferents microorganismes capaços de degradar els PAHs, com les algues, els bacteris i els fongs. Alguns dels bacteris aeròbics que són capaços de degradar els PAHs són del gènere *Pseudomonas*, *Burkholderia*, *Sphingomonas*, *Cycloclasticus*, *Rhodococcus*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium* [93, 101, 102,]. La biodegradació dels PAHs succeeix tant en condicions aeròbiques (presència d'oxigen) com anaeròbiques (absència d'oxigen) i la capacitat de degradació pot ser potenciada mitjançant el pretractament del sòl contaminat a través de l'aplicació de tasques mecàniques d'aeració fins l'addició de substàncies com nutrients, surfactants o l'addició de comunitats bacterianes (bioestimulació). Aquestes pràctiques són actualment aplicades, generalment, amb la finalitat de dur a terme tasques de bioremediació *in situ* i *ex situ* (per exemple, en bioreactors) [103, 104, 105]. Les principals vies de degradació dels PAHs per bacteris i fongs es troben representades a la Figura 11 [106]. La degradació aeròbica dels PAHs per part de les comunitats bacterianes tenen en comú l'oxidació de l'anell aromàtic, a través dels enzims Cyt-P450 monooxigenasa i dioxigenasa, seguit d'un trencament del compost a metabòlits dels PAHs i/o CO₂, i succeeixen en tots aquells medis on hi ha una disponibilitat suficient d'oxigen.

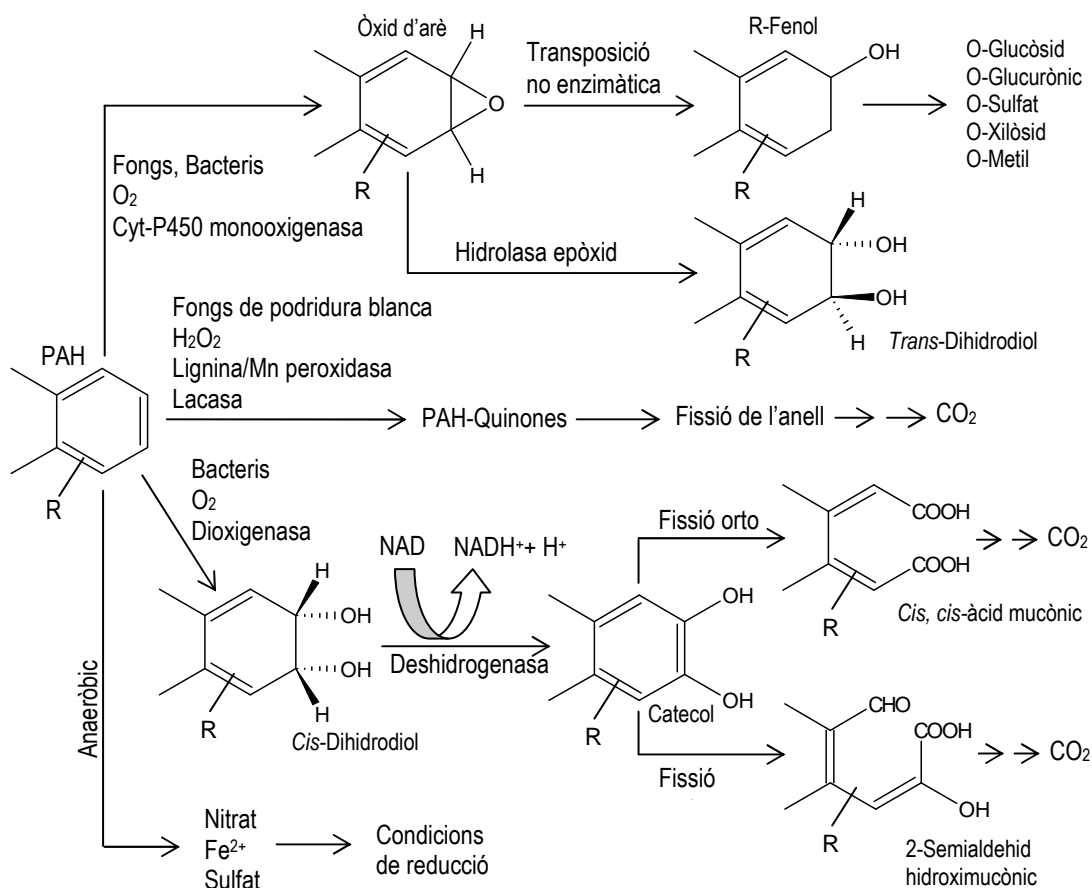


Figura 11. Vies principals de degradació dels PAHs per fongs i bacteris [106]

Per altra banda, el metabolisme anaeròbic dels PAHs té lloc en zones com aqüífers i sediments marins, tot i que alguns ambients aeròbics poden desenvolupar zones anaeròbiques quan s'ha esgotat l'oxigen del medi [107]. La via anaeròbica utilitza acceptors d'electrons alternatius a l'oxigen per oxidar els PAHs, com el nitrat, Fe^{2+} i sulfat, i no ha estat fins Tsai *et al.* (2009) en què s'ha començat a proposar mecanismes de la degradació anaeròbica d'alguns PAHs com el Phe i Flu [108], els quals semblen tenir lloc a través de la formació de fenol i àcid acètic fins la transformació final a metà i aigua. A més, s'ha pogut comprovar que aquest darrer tipus de degradació és més lent que el mecanisme aeròbic i, encara que és efectiu pels PAHs fins a tres anells, no hi ha evidències de la capacitat de degradació de PAHs de major pes molecular [100].

Hi ha diversos factors que influeixen positivament i negativament en la degradació dels PAHs, com s'ha mencionat anteriorment. Un d'ells és la quantitat d'oxigen disponible, i també el pH del medi el qual es pot veure afectat per la contaminació present. En general, s'ha observat que a rangs de pH entre 5,5 i 9,0 s'estableixen les condicions òptimes per la biodegradació dels PAHs [93]. Un altre factor influent en la degradació dels PAHs és la disponibilitat de nutrients, com el

carboni, el nitrogen i el fòsfor, els quals són fonamentals per dur a terme el metabolisme cel·lular i, per tant, per desenvolupar un bon creixement (amb una relació òptima de C:N:P de 100:15:3) [109]. Com que a les zones contaminades amb PAHs la quantitat de carboni sol ser alta, els nutrients poden veure's esgotats durant el metabolisme microbià, motiu pel qual és habitual introduir nitrogen i fòsfor als sòls contaminats per estimular les comunitats microbianes *in situ* i potenciar la bioremediació. Un dels factors més importants en la degradació dels PAHs és la biodisponibilitat del contaminant, relacionada amb la seva solubilitat i l'adsorció que té al medi, els quals són fenòmens afectats per la presència d'àcids húmics i fúlvics i per la capacitat d'intercanvi del sòl (conegut com a segrest) [110]. L'augment de la temperatura és un altre paràmetre que condueix a l'augment de la solubilitat dels PAHs i, per tant, de la seva biodisponibilitat. Tanmateix, també implica una disminució de la solubilitat de l'oxigen, la qual cosa condueix a la reducció de l'activitat metabòlica dels microorganismes (per via aeròbica). També es creu que la dosi en què es troba el contaminant és determinant, ja que s'ha observat que es produeix una inhibició parcial de l'activitat bacteriana en sòls i sediments a partir d'una concentració de 30 mg PAH·kg⁻¹ [111]. Per últim, s'ha vist que és crucial considerar la interacció entre els diferents PAHs [99], ja que la presència de mescles de PAHs i altres fonts de carboni pot induir a inhibicions de tipus competitiu o bé afavorir, en d'altres casos, la degradació de PAHs de major pes molecular (HMWPAHs) a través d'un fenomen anomenat co-metabolisme. El co-metabolisme es defineix com una reacció enzimàtica no-específica entre un nou substrat que competeix amb un substrat primari de similar estructura per la zona activa de l'enzim. Aquest fenomen explica que l'activitat bacteriana que condueix a la degradació dels HMWPAHs es veu potenciada per la presència d'altres fonts de carboni amb estructures més simples. Algunes d'aquestes fonts de carboni inclouen els PAHs més petits (LMWPAHs) que actuen com a substrat inicial, activant el metabolisme dels microorganismes que, en absència d'aquests últims no degradarien els HMWPAHs [112]. Respecte d'altres fonts de carboni, Quantin *et al.* (2005) [113] van observar que la presència de cel·lulosa exercia una inhibició competitiva en la degradació dels PAHs, mentre que Ortiz *et al.* (2003) [114] van comprovar que la presència de piruvat afavoria la degradació del Phe.

Tots els paràmetres descrits provoquen un efecte en l'activitat i creixement dels microorganismes encarregats de la biodegradació dels PAHs, motiu pel qual s'han dut a terme múltiples estudis per esbrinar quina és la resistència i la capacitat d'adaptació d'aquests al medi en diferents condicions experimentals [115, 116]. S'ha vist que les principals vies d'adaptació dels

microorganismes són a través de la inducció i supressió d'enzims específics, així com de canvis genètics i l'enriquiment selectiu per part de certes comunitats bacterianes, en concret, les més resistents [100].

Així doncs, el camp d'estudi de la degradació dels PAHs ha desembocat en un interès creixent per l'anàlisi dels seus derivats, pel desenvolupament de metodologies de determinació d'aquests contaminants emergents i per la valoració del possible impacte d'aquest nou grup de substàncies.

1.3. HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS MONOHIDROXILATS

1.3.1. FONTS D'EMISSIÓ I CONTEXT ACTUAL

Els derivats monohidroxilats dels hidrocarburs aromàtics policíclics (OH-PAHs) constitueixen un grup de contaminants orgànics sobre els quals hi ha dipositat força interès, no tant per la seva persistència al medi ambient, ja que el seu temps de vida és força curt, però sí per la seva elevada toxicitat i també com a possibles biomarcadors per determinar l'exposició total dels humans als PAHs [117].

La formació dels OH-PAHs prové, principalment, de l'acció metabòlica dels éssers vius, tot i que també es poden generar directament a través de combustions, motors dièsel i per la fotooxidació dels PAHs. Són substàncies menys volàtils que els PAHs dels quals provenen i tenen més tendència a adsorbir-se a les partícules sòlides [127].

A l'anterior Figura 11 es pot observar un mecanisme general proposat de formació dels derivats hidroxilats (representats per l'espècie R-Fenol), els quals apareixen com a resultat d'una ruta metabòlica principalment aeròbica, a través de la utilització de l'enzim Cyt-P450 monooxigenasa, el qual forma primer els intermedis epòxids i, en una segona etapa d'hidròlisi o de transposició enzimàtica, desemboquen en la formació dels derivats monohidroxilats i dihidroxilats. Alguns dels derivats monohidroxilats estudiats a la bibliografia es mostren a la Figura 12.

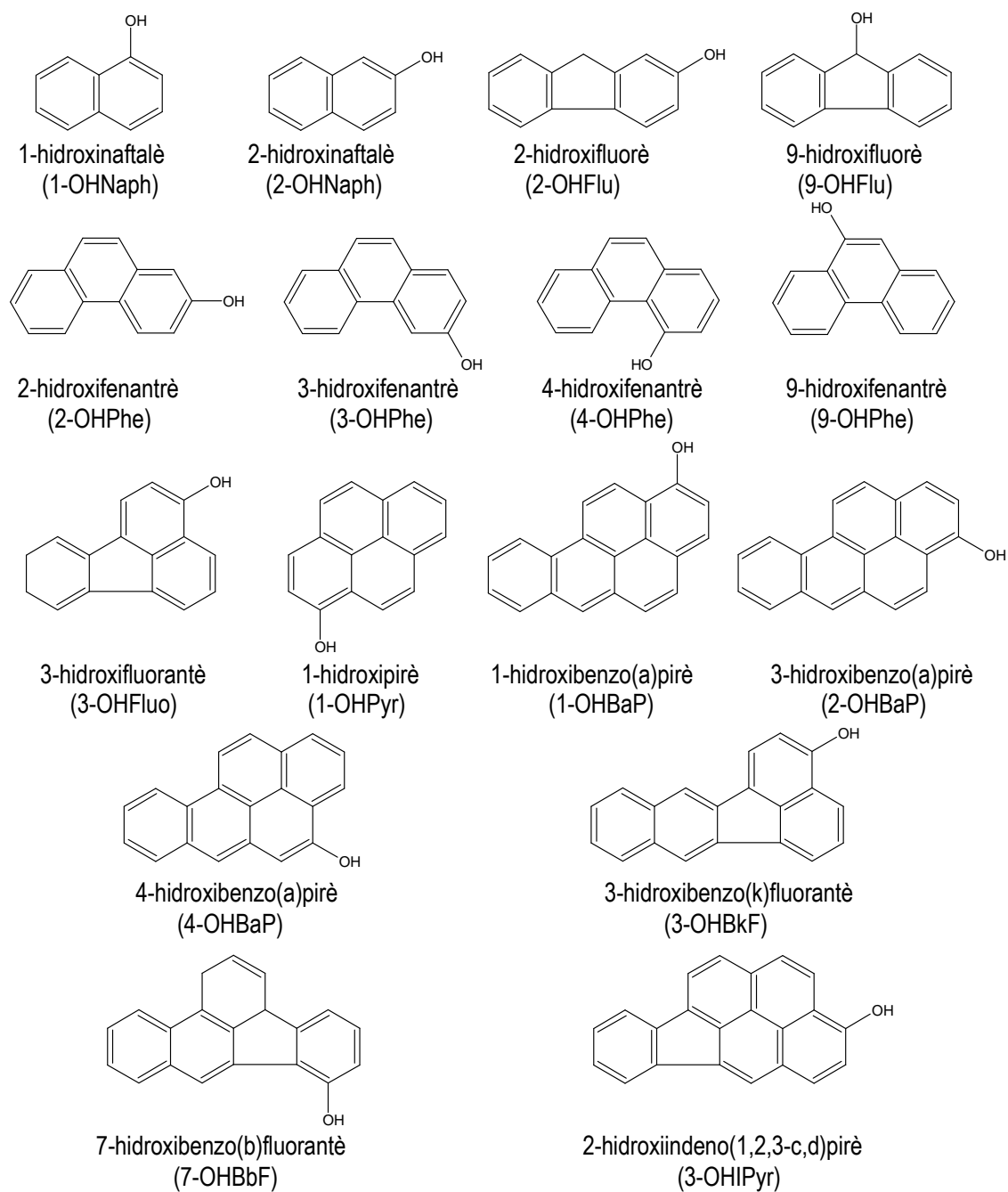


Figura 12. Estructura d'alguns OH-PAHs estudiats a la bibliografia

De totes maneres, hi ha alguns autors que han proposat altres mecanismes de formació més detallats basats en la identificació dels diversos metabòlits al llarg de la degradació dels PAHs per diferents espècies de microorganismes. Aquest és el cas de Luan *et al.* (2006), els quals van proposar un mecanisme de degradació del Flu per un consorci de bacteris en sediments de manglar que condueix a la formació de quatre derivats monohidroxilats diferents (Figura 13) [118].

Aquesta proposta està d'acord amb altres observacions realitzades per alguns autors que esmenten que el gènere *Pseudomonas* és capaç de metabolitzar el Flu a 9-OHFlu en un sol pas, el qual evoluciona a 9-fluorenona i àcid ftàlic. Alguns estudis sobre *Rhodococcus* també expliquen la formació del 2-OHFlu, conjuntament amb 2,7-dihidroxi fluorè, com a resultat de la degradació del Flu, tal i com proposen Luan *et al.* (2006). Per altra banda, aquests darrers autors també proposaven un mecanisme de degradació del Phe a través del 9-OHPhe, el qual podria provenir tant de la deshidratació del *cis*- com del *trans*-dihidrodiol, sent degradat a àcid benzoic 2-benzoilmetilèster fins a àcid ftàlic (Figura 14).

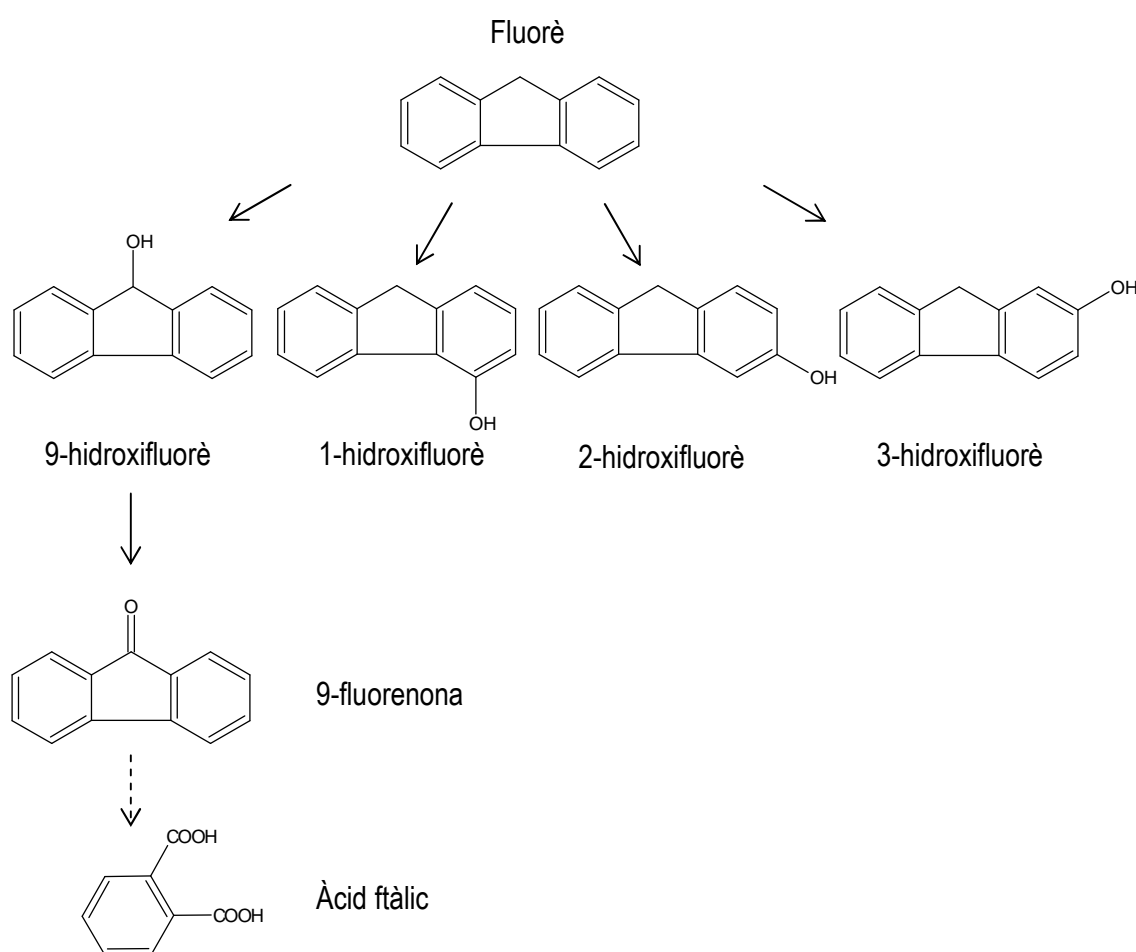


Figura 13. Proposta de mecanisme de degradació del Flu pel consorci de bacteris dels sediments de manglar. Les fletxes sòlides indiquen una única reacció mentre que les puntejades indiquen dues o més etapes per assolir la transformació [118]

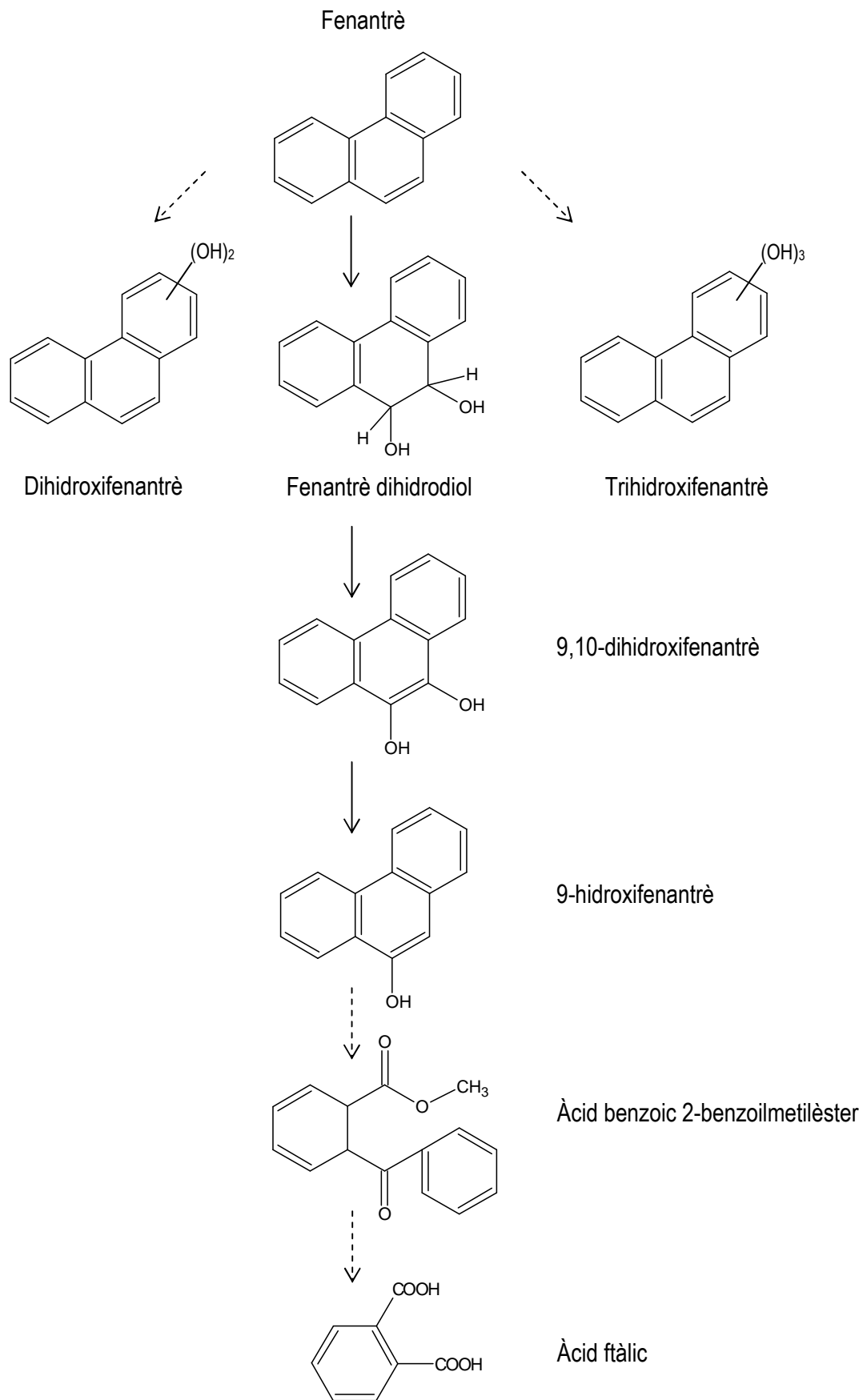


Figura 14. Proposta de mecanisme de degradació del Phe pel consorci de bacteris dels sediments de manglar. Les fletxes sòlides indiquen una única reacció mentre que les puntejades indiquen dues o més etapes per assolir la transformació [118]

1.3.2. EXPOSICIÓ I TOXICITAT

Com s'ha comentat anteriorment, la via principal d'exposició als OH-PAHs es produeix com a resultat de l'acció metabòlica dels éssers vius en haver estat exposats als PAHs. De totes maneres, els OH-PAHs generats per l'acció de combustions poden ser inhalats i adsorbits a la pell, així com ingerits a través del consum de menjar contaminat provinent d'animals i vegetació exposats a aquests compostos.

Els estudis sobre toxicitat suggereixen que els OH-PAHs són més tòxics que els PAHs de partida, ja que aquests compostos actuen com a agents intercalants del DNA, interaccions governades principalment per la capacitat dels OH-PAHs d'establir ponts d'hidrogen i interaccions de tipus π - π amb les bases del DNA [119]. Aquest fet els classifica com a mutàgens i, per tant, potencials carcinògens, tot i que el seu efecte biològic es troba encara per determinar [120,121,122]. A més, un estudi amb 63 OH-PAHs va demostrar que els que posseïen de 3-5 anells exhibien activitat estrògena i antiestrògena, a causa de la seva similitud amb les hormones esteroides [123]. Entre els OH-PAHs, l'1-hidroxipirè (1-OHPyr) s'utilitza com a biomarcador per avaluar l'exposició humana als PAHs, sobretot a partir de la seva anàlisi en orines, ja que el seu precursor, el Pyr, és el PAH més abundant a l'aire, principal via d'exposició humana [97,124].

1.3.3. ANTECEDENTS

Els OH-PAHs han estat estudiats en diferents matrius biològiques (orina, sang, teixits), aigües, peixos i sediments, en canvi, la informació existent en sòls és molt limitada. Els OH-PAHs s'han extret de les matrius corresponents mitjançant mètodes similars als PAHs (MAE, PLE, SFE, etc.), els extractes han estat purificats amb mètodes com la SPE i la cromatografia en columna i s'han determinat a través de tècniques instrumentals com GC/FID [97], HPLC/MS i HPLC/FLD [125, 126,127], electroforesi capil·lar amb detecció fluorimètrica (CE/FLD) [128,129] i per GC/MS [130,131,132,133,134,135].

En sòls es troben molt pocs estudis sobre la determinació d'OH-PAHs. El primer va ser conduït per Meyer *et al.* (1999), al qual s'analitzaven 2 OH-PAHs dins una llista de determinació simultània de PAHs i hetero-PAHs. El mètode consistia en l'extracció Soxhlet, seguit d'un fraccionament de la mescla de compostos mitjançant una SPE amb sílice compactada i l'anàlisi final per GC/FID i HPLC/FLD. A part de l'evidència de la necessitat de llargs temps per completar

les anàlisis, el mètode presentava certes limitacions pel que fa als límits de detecció (DL) i quantificació (QL), de l'ordre dels $0,5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ [136]. Més endavant, Luan *et al.* (2006) van determinar 15 metabòlits com a resultat de la degradació dels PAHs en sediments mitjançant SPME-GC/MS, amb l'inconvenient de la necessitat de condicionar la fibra durant 60-120 min, seguit d'una immersió a la mostra durant 60 min més per l'adsorció dels compostos abans de procedir a la següent etapa [118]. Per altra banda, Bandowe i Wilcke (2010) van proposar un mètode simultani d'anàlisi de PAHs i derivats oxigenats (incloent 5 OH-PAHs), basat en PLE, una purificació amb columna i l'anàlisi per GC/MS [135]. Aquest mètode reduïa el temps de preparació de mostra abans de l'anàlisi però presentava baixos percentatges de recuperació dels OH-PAHs del sòl (2-OHNaph <40 %, 9-OHFlu <60 % i 9-OHPhe <7 %), així com poca reproductibilitat en les anàlisis (RSD del 29 % pel 2-OHNaph, 41 % pel 9-OHFlu i 9 % pel 9-OHPhe). Recentment, Wang *et al.* (2012) han aportat un mètode per l'anàlisi de 8 OH-PAHs (dos hidroxinaftalens, tres hidroxifluorens, dos hidroxifenantrens i un hidroxipirè), amb la utilització d'aigua supercrítica per a l'extracció, una etapa de purificació mitjançant SPE i l'anàlisi per GC/MS, i l'han aplicat a la identificació i quantificació d'aquests compostos com a producte de la degradació dels PAHs en sediments [98]. Tanmateix, aquests darrers tres mètodes segueixen requerint llargs temps a causa de la necessitat d'una reacció de derivatització dels OH-PAHs abans de l'anàlisi per GC/MS, la qual requereix entre 30-60 min. A més, en algun cas es van trobar que la reacció amb l'agent derivatitzant no era completa i no s'arribava als percentatges de conversió desitjats, sobretot per la presència d'àcids húmics i fúlvics al sòl, fet que es traduïa en una alta presència d'interferències durant l'anàlisi d'aquests compostos.

Per tal de reduir l'elevat nombre d'interferències i alhora augmentar la sensibilitat de l'anàlisi de diferents tipus de contaminants orgànics en diferents matrius, la comunitat científica ha començat a utilitzar els polímers impregnatats molecularment (MIPs) com a eina d'extracció/purificació selectiva de diferents compostos, en molts casos, compactats en cartutxos de SPE [137,138]. Tanmateix, el potencial que ofereixen els MIPs encara no ha estat explotat en l'àmbit dels sòls per a la purificació dels derivats monohidroxilats dels PAHs després de la seva extracció.

1.3.4. POLÍMERS IMPREGNATS MOLECULARMENT

Els polímers impregnatats molecularment (MIPs) han estat el centre d'atenció de força investigadors durant els darrers anys a causa del seu potencial únic de separació. Els MIPs són

polímers altament entrecreuats capaços de reconèixer selectivament la forma i els grups funcionals d'una molècula (o molècules) amb estructura similar a les d'una molècula motlle utilitzada en la seva preparació [139]. Es diu que els MIPs tenen "memòria" i permeten el reconeixement selectiu de compostos inclús en presència de molècules amb estructures i funcionalitats similars a les del motlle utilitzat.

SÍNTESI

La producció d'un material d'aquestes característiques es porta a terme a través d'un procediment d'impremta específic, generalment senzill i econòmic. Les dues estratègies utilitzades habitualment en la preparació dels MIPs es basen en la formació d'enllaços covalents o no-covalents entre el motlle i els monòmers funcionals [140,141]. De manera general, tal i com es mostra a la Figura 15, els MIPs es preparen mitjançant la formació d'un complex entre un analít (motlle) i un monòmer funcional, per autoensamblatge. A continuació es porta a terme la polimerització en presència d'un gran excés de monòmers de reticulació (*crosslinkers*) i un iniciador radicalari, en el solvent adequat, normalment apròtic i apolar. En aquesta etapa s'aconsegueix obtenir un polímer amb estructura tridimensional, molt rígida i amb alt grau d'entrecreuament. Després de la polimerització es porta a terme l'extracció del motlle, que en funció de l'estratègia de síntesi es realitza amb una solució aquosa (àcida o bàsica), metanol o a partir d'una reacció d'hidròlisi. Finalment, el polímer imprimit resultant posseeix una sèrie de zones de reconeixement complementàries en forma, mida i funcionalitat a les de la molècula motlle [142,143]. L'estructura tridimensional adquirida i l'elevat grau d'entrecreuament permet conservar la forma i l'estabilitat de les microcavitats formades un cop extret el motlle, de manera que els grups funcionals romanen en una configuració òptima que assegura el reconeixement de les molècules similars al substrat original [140].

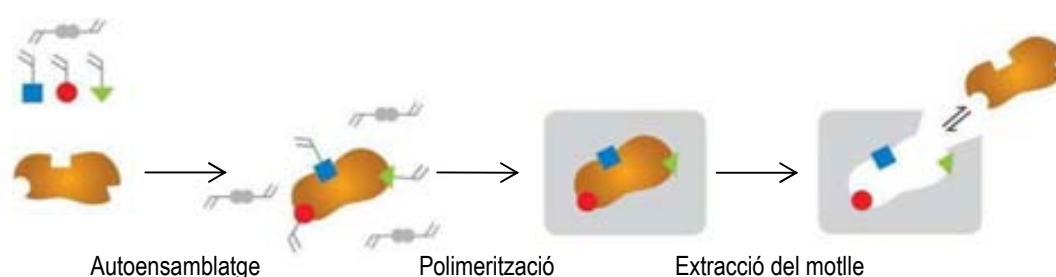


Figura 15. Esquema general de la síntesi dels MIPs [141]

Sovint, però, la síntesi d'un nou MIP requereix molt temps, rentats i proves abans de trobar les condicions òptimes de síntesi i utilització. D'altra banda, un dels desavantatges és el disseny de

MIPs compatibles amb aigua, ja que aquesta competiria amb el motlle, debilitant-lo o destruint les interaccions no covalents entre el motlle i el monòmer funcional [144]. Aquest fet constitueix una limitació important pel que fa a algunes aplicacions clíniques i mediambientals (ja que molts compostos perden la seva activitat en solvents orgànics).

RECOXEIEMENT MOLECULAR

La força conductora principal que governa la interacció selectiva entre els analits i els MIPs és el reconeixement de la forma, mida i naturalesa dels grups funcionals [144], és a dir, el reconeixement molecular. Aquest depèn de diferents factors, com la complementarietat de la mida i dels grups funcionals, així com de les contribucions de l'ambient que els rodeja. Quant a la complementarietat funcional, el que determinarà la qualitat i el rendiment del polímer dependrà de la naturalesa del motlle, els monòmers i la reacció de polimerització, així com també la possibilitat d'interaccions de tipus no-covalents (ponts d'hidrogen, dipol-dipol). D'altra banda, la quantitat i qualitat dels llocs de reconeixement (i per extensió, de les interaccions que tenen lloc a la mescla inicial monòmer-motlle) també influeixen de forma important en el bon comportament dels MIPs [139].

EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA BASADA EN POLÍMERS IMPREMTATS MOLECULARMENT (SPE MIPs)

L'ús dels MIPs ha resultat molt atractiu per molts camps de la química i biologia, particularment com a material d'afinitat per la fabricació de sensors i per la producció d'anticossos artificials, com a adsorbents per a SPE i com a fases estacionàries en les cromatografies. També s'utilitzen en catàlisi i en *drug delivery* [137,138].

L'aplicació més habitual i explotada en aquesta tesi doctoral és la utilització dels MIPs compactats en un cartutx de SPE per a la purificació selectiva d'extractes de matrius procedents de mostres complexes.

Les principals característiques de la SPE MIPs són [143,145]:

- ✓ Alta afinitat i selectivitat gràcies a la modificació del polímer amb la empremta molecular
- ✓ Estabilitat als canvis de pH i estabilitat tèrmica

- ✓ Alta estabilitat de conservació, la qual cosa permet preservar-ne l'activitat, amb alta resistència mecànica i durabilitat davant la calor i pressió
- ✓ Inèrcia química en front d'àcids, bases, ions metàl·lics i solvents orgànics
- ✓ Alta reproductibilitat i robustesa
- ✓ Metodologia ràpida
- ✓ Disminució dels DL i QL ja que, en tractar-se d'una SPE, comporta un factor de concentració

Les etapes necessàries per dur a terme una SPE MIPs (algunes de les quals es troben representades a la Figura 16) són [141,142,144]:

- ✓ **Preparació de la mostra:** necessari per obtenir una solució de càrrega compatible amb les condicions de retenció a la columna de SPE. En cas de mostres sòlides cal fer les extraccions pertinents amb els solvents compatibles.
- ✓ **Condicionament del cartutx:** els cartutxos de SPE es condicionen amb els solvents apropiats per impregnar completament l'adsorbent i permetre les interaccions entre aquest i els analits.
- ✓ **Càrrega de la mostra:** la solució que es percola s'introdueix al cartutx de SPE. En aquesta etapa l'analit queda retingut a la fase adsorbent juntament amb algun compost no desitjat.
- ✓ **Rentat:** en aquesta etapa s'eliminen els interferents i compostos no desitjats a través de la utilització de diferents solvents.
- ✓ **Elució:** l'analit d'interès és recuperat del cartutx de SPE.

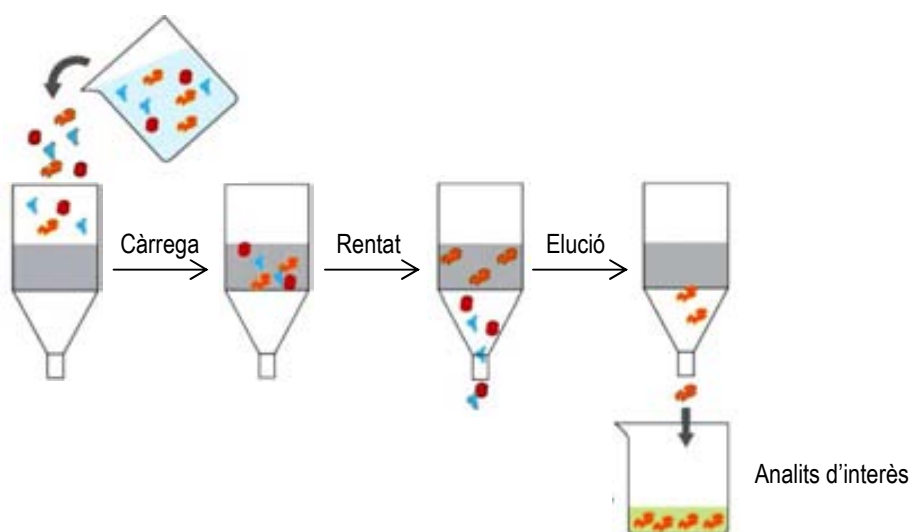


Figura 16. Esquema de les etapes que cal seguir per dur a terme una SPE MIPs [141]

Per obtenir una selectivitat òptima, el procediment d'extracció aplicat a la mostra ha de permetre a la molècula diana interaccionar específicament amb els monòmers ancorats a les cavitats del polímer. D'altra banda, el procediment d'extracció ha de permetre a l'analit desenvolupar fortes interaccions amb els monòmers presents a les cavitats alhora que exclou les interaccions no-covalents dels analits d'interès i d'altres compostos amb els monòmers que cobreixen la superfície del polímer (fora de les cavitats). Així doncs, el procediment de SPE s'ha de basar en l'ús d'un solvent pel pas de percolació i rentat que posseeixi suficient força eluotròpica per trencar les interaccions superficials de baixa energia sense afectar les interaccions que es donen a les cavitats impremtades [144]. Per assegurar que no existeixen interaccions de tipus no-covalent a la superfície del polímer, es poden utilitzar els NIPs de forma paral·lela. Els NIPs són el mateix polímer que els MIPs però sense la empremta molecular i, per tant, si s'observa retenció d'algun tipus de compost no serà per l'acció del reconeixement molecular sinó per interaccions de tipus no-covalent. De manera general, les diferències de retenció de compostos als MIPs i NIPs es poden comprovar a partir del dopatge de la matriu d'estudi amb solucions de mescles de patrons. L'ideal és que els NIPs s'apliquin a la mateixa matriu ambiental que els MIPs, per tal d'avaluar els efectes d'aquesta i de les interferències presents en el procés de retenció.

APLICACIONS DE LA SPE MIPs

Les principals aplicacions dels MIPs com a tecnologia de SPE estan focalitzades en la preparativa de mostra, és a dir, de tasques com l'extracció selectiva dels components d'una matriu, la purificació d'aquest extracte, l'anàlisi a nivell traça i l'enriquiment de solucions [141]. En el camp de l'anàlisi mediambiental i de la salut, la SPE MIPs s'ha utilitzat recentment de forma exitosa en l'anàlisi de compostos orgànics en mostres de menjar (cereals [146], mel [147], olis vegetals [148], etc.), de drogues en mostres biològiques [149,150,151]. En mostres aquoses també s'ha aplicat per la determinació d'estrògens [152], fenols [153], cafeïna [154], etc., i per l'especiació de metalls i estudis d'adsorció d'aquests com a potencials tasques de remediació [155,156]. En sòls, en canvi, l'aplicació de la SPE MIPs és força limitada. La gran majoria d'autors se centren en la seva aplicació per la determinació de residus d'herbicides [157,158], insecticides [159,160], fungicides [161], antibiòtics [162,163], residus plàstics [164], residus de resines [165,166], etc. Tanmateix, existeix la possibilitat d'utilització de la SPE MIPs per la purificació de derivats fenòlics, com per exemple els nitrofenols, clorofenols, catequines i també pels metabòlits hidroxilats dels PAHs [141].

1.4. METALLS PESANTS

Els metalls pesants (HM) es troben presents a concentracions relativament baixes ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) a l'escorça terrestre, sòls i plantes. Molts d'ells són essencials pel creixement i desenvolupament dels éssers vius tot i que poden arribar a ser tòxics si excedeixen certs llindars. Els HM més abundants als sòls es poden classificar en quatre categories en funció de la forma química en què es troben a la solució del sòl, tal i com es mostra a la Taula 6, tot i que aquestes no tenen perquè excloure's entre ells ja que molts HM poden trobar-se en diferents formes químiques (especiació). De tots ells, 17 són considerats molt tòxics i, a la vegada, fàcilment disponibles en sòls a concentracions que superen els nivells de toxicitat permesos (Ag, As, Bi, Cd, Co, Cu, Hg, Ni, Pb, Pd, Pt, Sb, Se, Sn, Te, Tl i Zn) [9].

Taula 6. Classificació dels metalls pesants en diferents formes químiques [9]

| Categoria | Espècies |
|------------------|---|
| Cations | Ag^+ , Cd^{2+} , Co^{2+} , Cr^{3+} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} |
| Metalls nadius | Hg, V |
| Oxoanions | AsO_4^{3-} , CrO_4^{2-} , MnO_4^{2-} , HSeO_3^- , SeO_4^{2-} |
| Organocomplexes | Ag, As, Hg, Se, Te, Tl |

Aquesta capacitat de distribuir-se en diferents formes químiques els permet associar-se a diversos components del sòl, tant de naturalesa mineral com orgànica. Per tant, la determinació del contingut total de metalls en un medi significa implícitament que es considera que totes les espècies d'un metall tenen el mateix impacte en el medi ambient i un comportament similar en el cicle biogeoquímic. Aquesta simplificació es acceptable geològicament a llarg termini (milions d'anys), però es inadequada per l'avaluació de processos a curt termini, per la qual cosa és important discriminar les localitzacions d'un element en les diferents fases específiques del sòl, donat que fraccions importants del contingut total del metall es poden trobar biodisponibles i influir un estrès sobre els éssers vius. No obstant això, el contingut total de metalls es pot considerar en tasques relacionades amb el control de la contaminació en sòls per verificar el compliment de les normatives establertes per la legislació, ja que aquestes fan referència a les concentracions totals [167].

1.4.1. FONTS D'EMISSIÓ I CONTEXT ACTUAL

Els HM es troben de forma natural al sòl per processos de meteorització dels materials parentals a nivells considerats traça i són rarament tòxics. La presència de concentracions anòmales de metalls prové, principalment, de les emissions per fonts antropogèniques, les quals s'estimen que són tres vegades superiors als fluxos de HM presents de forma natural al sòl. Els HM procedents de la contaminació antropogènica solen ser més mòbils i, per tant, també més biodisponibles que els d'origen litògen. Els sòls poden veure's contaminats per l'acumulació de HM a través d'emissions a zones en ràpida expansió industrial, explotacions mineres, combustió de gasolines amb plom, ús de pintures, aplicació de fertilitzants al medi, fems d'animals, llots de depuradores, ús de pesticides, reg amb aigües residuals, residus de combustió del carbó, vessament de productes petroquímics, etc. [168, 169]. Els HM són distribuïts per diferents mecanismes de transport fins arribar al sòl on, amb el pas del temps, pateixen canvis en la seva forma química (especiació), en la seva distribució al mateix sòl (mobilitat) i en l'accés per part dels microorganismes i de les plantes del sòl (biodisponibilitat). Aquests canvis poden afectar de manera important alguns processos metabòlics dels microorganismes presents al sòl, com ara la degradació de compostos orgànics (per exemple, dels PAHs), fins arribar a inhibir-la parcialment o totalment. A més, a diferència dels contaminants orgànics, els HM no es veuen oxidats pels microorganismes ni degradats químicament i la seva concentració als sòls persisteix al llarg del temps (excepte per la formació d'alguns complexos organometàl·lics [170]).

La contribució en l'emissió de HM al medi ambient per part dels diferents sectors (producció d'energia, transport, producció de productes químics, agricultura, etc.) és molt variable, ja que sovint depèn de les aplicacions per les quals s'utilitzin. Per exemple, les emissions més importants de Pb als sòls provenen del desgast de pintures i del sector de l'automòbil, mentre que pel cas del Ni la major contribució prové dels residus de depuradores i el seu ús en fertilitzants. En canvi, la principal font de contaminació del sòl amb Cu prové del seu ús industrial i energètic. Segons les dades del *Centre on Emission Inventories and Projections* (CEIP) a través de l'*European Monitoring and Evaluation Programme* (EMET) que proporciona suport a la *Convention on Long-range Transboundary Air Pollution* (LRTAP), la gran majoria de països de la Unió Europea han reduït considerablement l'emissió de metalls (Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) des del 1990-2011, amb l'excepció de Xipre (Figura 17) [171].

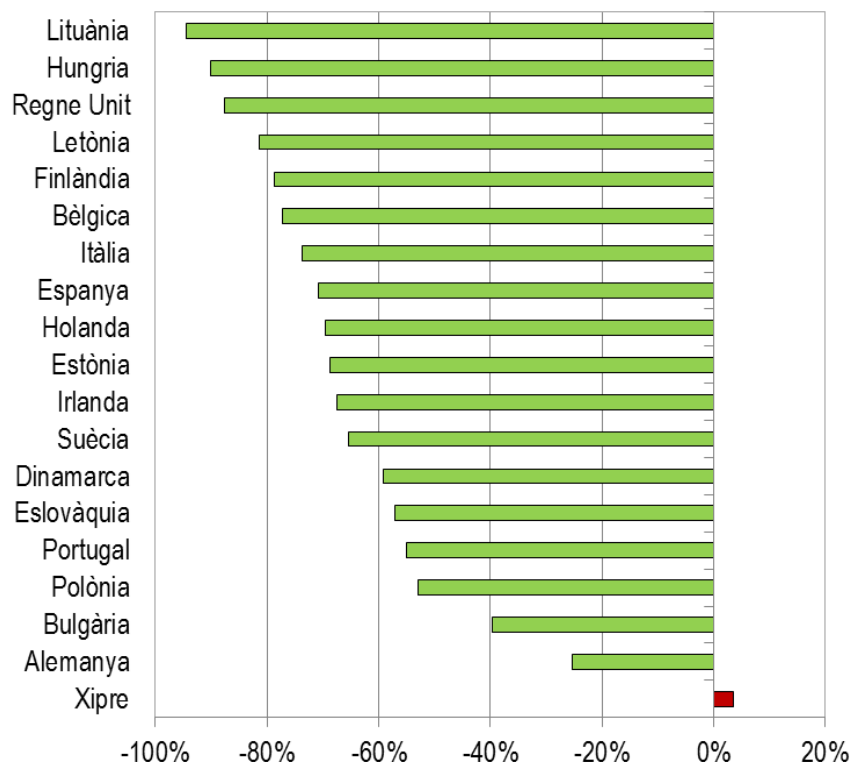


Figura 17. Percentatge de reducció o increment de l'emissió de metalls (Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) des del 1990-2011 per alguns països de la Unió Europea [171]

Cal tenir en compte, però, que els nivells d'emissió d'aquests metalls són molt heterogenis en cada país, tal i com es mostra a la Figura 18. Els números reflecteixen que Alemanya, Polònia, Itàlia i Espanya són els països amb més emissions de metalls, tot i haver-les reduït en un 25 % pel cas d'Alemanya, 53 % per Polònia, 74 % per Itàlia i 71 % per Espanya en els darrers 16 anys.

Tot i la reducció en l'emissió de HM de forma global, si es miren amb detall les emissions de diferents metalls per cadascun dels països, es pot veure, pel cas d'Espanya (Figura 19), que tot i que la contaminació amb Pb ha estat reduïda molt considerablement, les emissions de Zn i de Cu han augmentat més del doble en els darrers 16 anys. Això ressalta la necessitat de seguir invertint esforços en l'eliminació de residus que contenen metalls per complir amb la legislació vigent i amb els reptes de futur de minimitzar la contaminació per aquests elements.

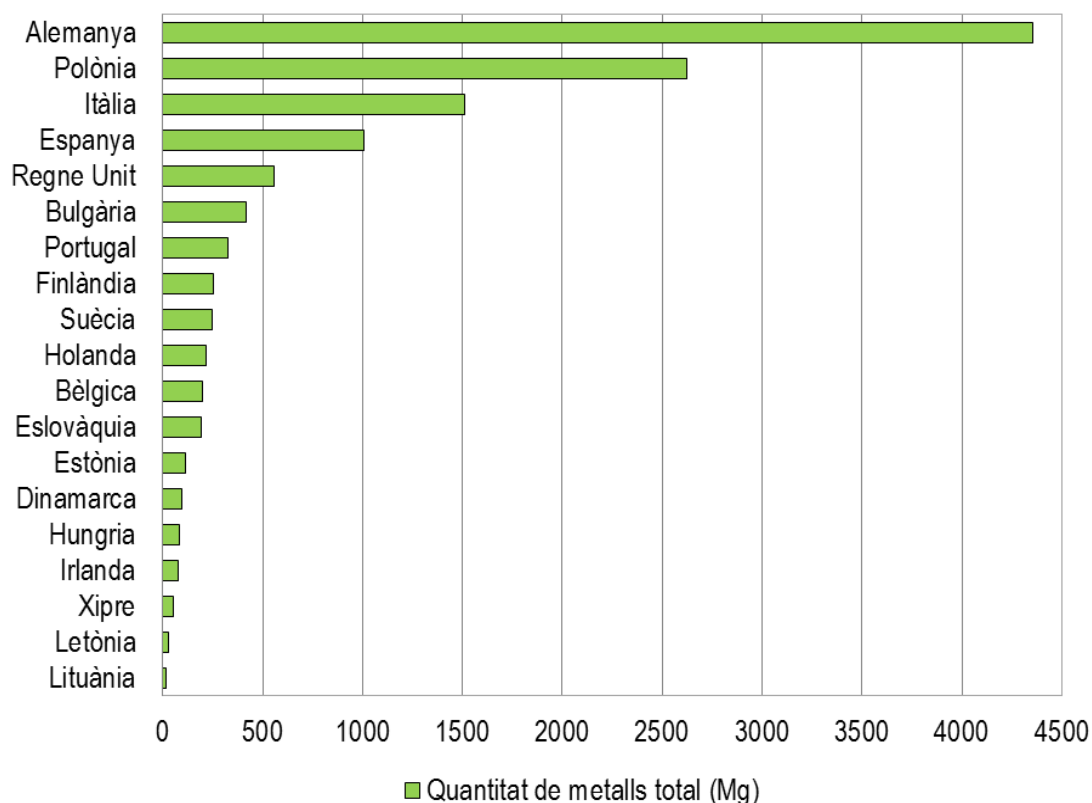


Figura 18. Quantitat de metalls emesos (Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) el 2011 per alguns països de la Unió Europea (Mg) [171]

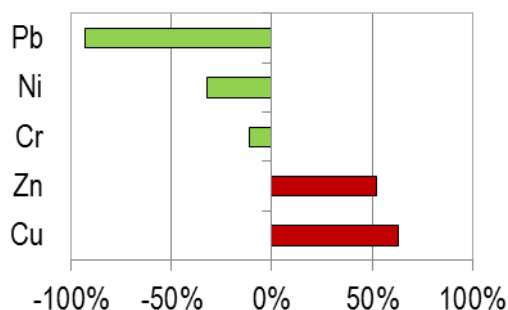


Figura 19. Percentatge de reducció o increment de l'emissió de metalls (Cr, Cu, Ni, Pb, Zn) des del 1990-2011 per part d'Espanya [171]

1.4.2. EXPOSICIÓ I TOXICITAT

La via més directa d'exposició humana als metalls es dona a través d'activitats de cultiu destinades al consum de menjar i la ingestió d'aigua contaminada. Tot i això, la inhalació de partícules en suspensió o el contacte amb sòl contaminat constitueixen, també, vies d'exposició a aquests elements. Els rangs de concentració de HM trobats habitualment en sòls es mostren a la Taula 7.

Taula 7. Concentracions geoquímiques normals d'alguns metalls pesants [8,168,172,173].

| Metall pesant | Concentració en sòls (mg·kg⁻¹) |
|----------------------|--|
| Cr | 10-50 |
| Mn | 300-1000 |
| Co | 1-10 |
| Ni | 2-100 |
| Cu | 2-60 |
| Zn | 20-200 |
| Pb | 10-150 |

No totes les formes dels metalls són tòxiques i són els fenòmens de mobilitat i, en conseqüència, disponibilitat el que els fa més perillosos. En general, la mobilitat dels metalls és baixa i tendeixen a acumular-se a la capa superficial del sòl i, a partir d'aquí, són lixiviats a horitzons inferiors en baixes quantitats [8,174]. Un cop al sòl, els metalls són inicialment adsorbits per reaccions ràpides (minuts, hores), seguit d'una adsorció lenta (dies, anys) i són redistribuïts en diferents espècies químiques variant-ne la biodisponibilitat, mobilitat i toxicitat. Al sòl, aquesta distribució es troba controlada per la precipitació/dissolució dels minerals, les reaccions d'intercanvi iònic, d'adsorció i desorció, les reaccions de complexació i la immobilització biològica [168]. Un dels factors influents en la mobilitat dels metalls és el pH del medi, ja que la seva disminució afavoreix la solubilització dels metalls. Un altre factor important és el contingut en matèria orgànica (OM), ja que aquesta reacciona amb els metalls formant complexos de canvi o quelats, promovent la seva estabilització, o bé formant complexos solubles, augmentant la mobilitat i disponibilitat. La presència de carbonats contribueix al manteniment de pH alts i la precipitació de la gran majoria de metalls, amb l'excepció d'alguns com l'As, Se, Cr, Mo. L'augment de la salinitat provoca un increment de la mobilització o de la retenció a través de dos mecanismes principals, per una banda, l'intercanvi iònic de metalls amb Na⁺ i K⁺ i, per l'altra, la formació de compostos més estables amb anions com el Cl⁻ i SO₄²⁻.

La toxicitat dels metalls és un dels problemes més greus de salut ambiental i és potencialment perillosa per la bioacumulació que es produeix a la cadena alimentària. En general, els efectes tòxics depenen de la concentració de l'element a la dieta, l'absorció de l'element per part del sistema, el control homeostàtic del cos front l'element i les espècies animals involucrades. El Cd,

Pb i Hg són els metalls sobre els quals hi ha dipositada més atenció en les principals zones de contaminació (aire, aigua, menjar i sòls), els quals s'associen a efectes nocius en la salut dels éssers vius. Se sap que exerceixen una influència en el control de les funcions biològiques afectant el sistema hormonal i el creixement dels teixits. A més, alguns d'aquests metalls s'acumulen en òrgans del cos i no només poden resultar perillosos com a resultat d'exposicions agudes o cròniques sinó que poden passar a la següent generació i representar una toxicitat potencial des del punt de vista de la salut [175]. A continuació, es presenten breument algunes de les característiques dels set metalls estudiats en aquesta tesi doctoral (Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Pb).

CROM

Les fonts naturals majoritàries de Cr inclouen les erupcions volcàniques, l'erosió dels sòls i roques i el fum dels incendis forestals, mentre que les fonts d'origen antropogènic provenen de la indústria metal·lúrgica, la combustió del petroli, la indústria del ciment i la producció de materials refractaris i de productes químics [176]. El Cr s'utilitza principalment en la fabricació d'aliatges metàl·lics per a usos especialitzats ja que proporciona un recobriment brillant i protector a les superfícies de Fe. Encara que el Cr (VI) és carcinogen quan s'ingereix o s'absorbeix a través de la pell i els pulmons, es necessiten petites quantitats de Cr (III) en la dieta ja que, juntament amb la insulina, ajuda al control del nivell de glucosa a la sang. Altres efectes com a resultat de l'exposició a concentracions anòmales de Cr també provoquen irritabilitat, fatiga i danys al sistema nerviós [177,178].

MANGANÈS

El Mn és troba present de forma natural a les roques, sòl i aigua, i representa el 0,1 % de l'escorça terrestre. Tanmateix, l'emissió de Mn al medi ambient inclou els abocaments de tractament i gestió de residus, llots de depuradores, activitats mineres, residus d'aliatges, producció d'acer, ferro i vidre, llumins i pirotècnia, combustió de residus fòssils, etc. [177,178]. El Mn és necessari per una gran varietat de funcions metabòliques, per l'activació de certs enzims del sistema immunològic i pel sistema de regulació de les hormones sexuals. La inhalació, el contacte o la ingestió de Mn pot causar danys al sistema nerviós central i desequilibris neuro-psiquiàtrics [179].

COBALT

El Co és un altre element indispensable pels humans ja que es troba a la vitamina B12, la qual s'usa en el tractament contra l'anèmia perniciosa. El Co també intervé en el funcionament d'alguns enzims però, per altra banda, facilita la conversió de mercuri elemental i espècies insolubles de mercuri a metilmercuri, $[CH_3Hg^+]$, i altres espècies solubles i molt tòxiques [177]. El Co s'utilitza per la producció d'aliatges, dents de les serres i màquines de perforació, en la indústria de la ceràmica i el vidre, així com a material d'unió de peces i pròtesis. El menjar i les begudes constitueixen la principal font d'exposició al Co, seguides de la inhalació i l'absorció a través de la pell. La toxicitat del Co es pot manifestar en forma d'irritació de mucoses, nàusees, diarrees, dermatitis, hipotiroïdisme, i és considerat un probable carcinogen per la IARC (Grup 2A) a causa de la seva capacitat d'associació amb el carbur de tungstè [180,181].

NÍQUEL

El Ni és un metall essencial a nivell nutricional per a moltes espècies animals, microorganismes i plantes. Les fonts naturals de Ni són el resultat de l'erosió de roques i sòls, les emissions volcàniques, i els focs forestals. Per altra banda, les principals emissions de caràcter antropogènic són la crema de carbó, dièsel i gasolines, les activitats d'incineració, els residus de depuradores, el tabac, els implants ortopèdics i la fabricació de peces de joieria. El Ni s'utilitza també per la producció d'aliatges amb alta resistència a la corrosió i temperatura, motiu pel qual és àmpliament utilitzat a la indústria metal·lúrgica. També és utilitzat pel processament de menjars i productes químics, especialment com a catalitzador i pigments [182]. La principal via d'exposició al Ni té lloc a través de treballs ocupacionals, el consum d'aigua i menjar contaminat, així com el contacte amb estris d'acer inoxidable, ja que el Ni s'utilitza pel recobriments de molts materials, podent causar al·lèrgies a la pell. Altres efectes tòxics com a resultat de la inhalació de partícules en suspensió que contenen Ni poden aparèixer a l'aparell respiratori i al sistema immunològic, sent la irritació el principal efecte a baixes dosis però podent esdevenir un potent carcinogen a altes dosis [182].

COURE

El Cu és el tercer metall de transició més important biològicament després del Fe i el Zn, ja que és un component essencial dels metal·loenzims, en què actua com a donador o acceptor d'electrons en reaccions redox clau implicades amb la respiració mitocondrial, síntesi de melanina, producció de col·lagen, etc. Una deficiència d'aquest element incapacita al cos per la

utilització del Fe emmagatzemat al fetge [177]. A més, es troba present en moltes proteïnes, algunes responsables del transport d'oxigen a la sang dels invertebrats. Els principals efectes adversos com a resultat de l'enverinament o exposició a concentracions excessives de Cu inclouen anèmia, danys al fetge i ronyons i irritació estomacal i intestinal. El Cu també s'ha associat a malalties com l'Alzheimer i relacionades amb els prions, incloent l'encefalopatia espongiforme bovina [183]. La principal via d'exposició al Cu és a través del consum de menjar i aigua, i les principals fonts antropogèniques estan relacionades amb l'activitat minera, la producció de pesticides, la fabricació d'aliatges (llautó, bronze, monedes), utensilis de cuina, canonades, cablejats elèctrics i microelectrònica, recobriment de superfícies, fotografia i com a catalitzador en la indústria química, entre d'altres [178].

ZINC

El Zn és un element indispensable per la vida i la prova és que s'han identificat més de 200 enzims que l'utilitzen, un d'ells, les hidrolases, amb la funció d'hidròlisi dels enllaços P-O-P, P-O-C i C-O-C. La insuficiència de Zn, fet que s'ha observat a un terç de la població del món occidental, contribueix al cansament, letargia i desenvolupament de símptomes que condueixen a una menor resistència a les malalties [177]. El Zn s'ha utilitzat per la fabricació de pesticides i conservants de la fusta, producció de Fe, acer, llautó, fabricació de canonades, recobriment de metalls, etc. Les fonts antropogèniques primàries estan relacionades amb l'activitat minera i la indústria metal·lúrgica, l'abocament de residus i escòries, les refineries i la crema de combustibles fòssils, entre d'altres. L'exposició al Zn per contacte dèrmic pot produir un efecte corrosiu a la pell i provocar danys seriosos a les membranes cel·lulars, mentre que l'enverinament per ingestió podria comportar vòmits i diarrees [184].

PLOM

El Pb s'utilitza per la fabricació de bateries, recobriments de cables, canonades, munició, producció de tetraetilplom, absorbents del so, materials per la protecció dels rajos X i per reactors nuclears, pintures, insecticides, soldadura, etc. Tots els residus d'aquestes aplicacions i el contacte amb molts materials que contenen Pb constitueixen una aportació d'aquest metall de caràcter antropogènic al medi ambient, juntament amb les emissions produïdes pel fum del tabac, la crema de carbó i les activitats mineres [175]. El Pb entra al cos per diverses vies; per inhalació de la pols de pintures o residus de benzines amb plom, a través de la ingestió de menjar i aigua contaminats per activitats industrials, i per contacte dèrmic a través de l'exposició a cosmètics.

L'exposició crònica al plom pot causar anèmia, alguns tipus de càncer, danys reproductius, desequilibri hormonal, retard mental en nens, encefalopatia en infants, i danys als òrgans fonamentals (fetge, ronyó, estómac), entre d'altres [178].

A la Taula 8 es presenta la classificació dels metalls d'estudi d'acord amb la seva toxicitat segons la *International Agency for Research on Cancer* (IARC). Es pot veure que alguns compostos de Ni i Cr (VI) estan considerats com a carcinògens molt perillosos mentre que, per altra banda, alguns compostos de Mn i Zn no es troben, ni tan sols, contemplats en aquesta classificació.

Taula 8. Classificació segons toxicitat per la IARC dels metalls d'estudi [181]

| Metalls | Grup* | |
|----------------|---|----------------|
| | Cr metàl·lic | 3 |
| Cr | Compostos de Cr (VI) | 1 |
| | Compostos de Cr (III) | 3 |
| Mn | - | No classificat |
| | Co metàl·lic amb carbur de tungstè | 2A |
| | Co metàl·lic i compostos de Co | 2B |
| Co | CoSO ₄ i altres sals solubles de Co (II) | 2B |
| | Implants de Co | 2B |
| | Compostos de Ni | 1 |
| Ni | Ni metàl·lic i aliatges | 2B |
| | Implants de Ni i pols d'aliatges 66-77 % Ni | 2B |
| Cu | Cu 8-hidroxiquinolina | 3 |
| Zn | - | No classificat |
| | Compostos de Pb inorgànics | 2A |
| Pb | Pb metàl·lic | 2B |
| | Compostos de Pb orgànics | 3 |

1: Carcinogen pels humans; 2A: Probablement carcinogen pels humans; 2B: Possiblement carcinogen pels humans; 3: No classificable com a carcinogen pels humans; 4: Probablement no carcinogen pels humans.

1.4.3. LEGISLACIÓ VIGENT

Com a resultat dels processos d'industrialització, fabricació de materials, combustió de residus fòssils i demés activitats relacionades amb l'emissió de metalls, s'han creat una sèrie de directrius i regulacions per tal de controlar i minimitzar-ne les emissions, així com prevenir la destrucció de la biodiversitat i la quimiodiversitat i danys en la salut humana.

El 1998, l'*Aarhus Protocol on Heavy Metals*, com a ampliació de la *Convention on Long-range Transboundary Air Pollution* del 1979, va designar el Cd, Hg i Pb com a substàncies perilloses a monitoritzar [31]. Dins la Unió Europea, aparegué la *Directive 96/61/EC*, amb la intenció de prevenir o minimitzar la contaminació de l'aigua, l'aire i el sòl dels efluent industrials i altres residus d'instal·lacions relacionades amb la indústria, per la qual es requeririen les millors tècniques disponibles pel control i la reducció de les emissions de metalls a partir d'aquell instant [185]. Cinc anys després va aparèixer la *Directive 2001/80/EC*, mitjançant la qual es limitaven les emissions de metalls a l'aire per part de les grans plantes de combustió [186]. La *Directive 2008/50/EC* sobre la qualitat de l'aire va reemplaçar l'anterior *Directive 96/62/EC* i tres altres directrius, agrupant-les en una i aportant valors límits pel control de l'As, Cd, Hg i Ni [36].

També s'han creat directrius que regulen l'emissió dels metalls en aigües costaneres i de consum, com per exemple la *Water Framework Directive (2000/60/EC)* [39] i, en l'àmbit del menjar i aliments, com per exemple la *Regulation EC 1881/2006*, *Regulation EC 333/2007* i la *Directive 2002/32/EC*, a la qual es llisten una sèrie de substàncies indesitjables en l'alimentació dels animals (Pb, Cd, As, Hg) [187], així com la *Regulation 629/2008*, modificació de l'*EC 1881/2006*, a la qual s'estableix una concentració límit de certs contaminants.

En sòls, una de les primeres directrius (*Directive 86/278/EEC*) fou enfocada al control del nivell de metalls pesants en llots de depuradores utilitzats com a fertilitzants en tasques agràries per tal de prevenir els possibles efectes negatius en sòls, vegetació, animals i humans [188]. Més endavant, la *Directive 2004/35/CE* va establir un règim de responsabilitat pels danys produïts al medi ambient. La directriu aplicava el principi de "qui contamina, paga", segons la qual el contaminador és el responsable dels danys que ocasiona. El responsable dels danys ocasionats, decidit de manera objectiva, és un "operador" que porta a terme una sèrie d'activitats perilloses llistades a la directriu [189]. Arran d'aquesta directriu, van aparèixer diverses iniciatives a Europa per la remediació de sòls contaminats, com l'*EU Waste Framework Directive (2006/12/EC)* i l'*EU*

Integrated Pollution Prevention and Control Directive 2008/1/EC. Com que la legislació en sòls no és massa estricta, també hi ha organismes o departaments no governamentals destinats a proporcionar suport tecnològic per a la creació de les polítiques europees, com és el cas de *The European Commission's Joint Research Centre (JRC)*, que proposa una sèrie de valors límits pels diferents metalls en sòls (Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn) en funció del pH del medi [190]. A nivell espanyol, la legislació sobre els sòls està dictada pel *Real Decreto RD 1310/1990*, el qual neix de la *Directive 86/278/EEC* europea, però no s'ha establert una normativa estricta per declarar un sòl com a contaminat per HM [191]. El *Real Decreto 9/2005* llista una relació d'activitats potencialment contaminants del sòl i de criteris i estàndards per la declaració d'una zona contaminada, estableix els límits per compostos orgànics i deixa a les comunitats autònomes la responsabilitat de fixar els nivells i criteris amb relació als elements traça [44]. A la Taula 9 es presenta un resum de la legislació vigent a Catalunya en funció de l'ús del sòl (urbà o industrial), fixada per l'Agència de Residus de Catalunya en col·laboració amb el Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya [192]. També s'hi inclouen els límits fixats pel *Real Decreto 1310/1990*, que estableix la màxima concentració de metalls pesants en sòls i llots destinats a la seva utilització en el sector agrari [191].

Taula 9. Màxims nivells de metalls pesants permesos al sòl en funció del seu ús segons la legislació vigent a Catalunya, i màxims nivells de metalls pesants permesos en sòls i llots destinats al sector agrari segons la legislació espanyola [191,192]

| Metall pesant | Catalunya ^a | | Espanya ^a |
|---------------|---------------------------------------|---|-------------------------------------|
| | Ús urbà (mg·kg ⁻¹ pes sec) | Ús industrial (mg·kg ⁻¹ pes sec) | Real Decreto ^b 1310/1990 |
| Cr | 1000 | 1000 | 100-1500 |
| Mn | No especificat | No especificat | No especificat |
| Co | 45 | 90 | No especificat |
| Ni | 470 | 1000 | 30-400 |
| Cu | 310 | 1000 | 50-1750 |
| Zn | 650 | 1000 | 150-4000 |
| Pb | 60 | 550 | 50-1200 |

^a Valors només proporcionats pels metalls d'estudi, ^b Interval de concentració en funció del pH del medi

1.4.4. ANTECEDENTS

Des de fa temps es coneix l'existència dels HM i s'han dut a terme multitud d'estudis per la seva determinació i especiació en gran quantitat de matrius (aire, aigua, menjar, fluids biològics, sòls i sediments, etc.) [193,194,195]. El seu efecte a nivell de toxicitat biològica també ha estat àmpliament estudiat [175,178,196], així com les possibilitats d'adsorció en biomaterials (com a potencials tècniques de bioremediació) [197]. En aquest treball se centra l'estudi dels HM en sòls i el seu impacte en processos de degradació de compostos orgànics.

El contingut de HM s'ha determinat, en mostres de sòls, per moltes tècniques diferents. Aquestes inclouen l'espectroscòpia d'absorció atòmica (AAS) [198,199], l'espectrofotometria d'emissió òptica amb font de plasma acoblat inductivament (ICP/OES) [200,201], l'espectrometria de masses amb font de plasma acoblat inductivament (ICP/MS) [202,203], el sincrotró [204,205], entre d'altres. Per la determinació de la concentració total de metalls als sòls amb la gran majoria de tècniques anteriors és necessària una digestió àcida, utilitzant fortes mescles oxidants (aigua règia, combinacions d'àcids amb H₂O₂, així com l'ús de certs percentatges de HF) mentre que també existeixen tècniques instrumentals com l'analitzador portàtil de fluorescència de rajos X (FP-XRF), el qual permet realitzar procediments d'escombratge de contaminants inorgànics *in situ*. Tot i que aquesta tècnica comporta avantatges quant a rapidesa i manipulació, la desavantatge principal és que permet la detecció i quantificació en l'ordre dels 10-60 mg·kg⁻¹ [199,206], mentre que les anteriors ofereixen límits de detecció i quantificació més baixos, fins als ng·kg⁻¹ pel cas de l'ICP/MS. La Taula 10 ofereix una comparació entre les tècniques instrumentals habitualment utilitzades en la determinació de HM [207].

Taula 10. Comparació entre paràmetres bàsics de l'AAS (flama), ICP/OES i ICP/MS [207]

| | | AAS (flama) | ICP-OES | ICP-MS |
|----------------------------------|-----------------------------------|--|--------------------------------------|---|
| Límit de detecció | | Molt bo per alguns elements | Molt bo per la majoria dels elements | Excel·lent per la majoria dels elements |
| Capacitat d'anàlisi | | 10-15 segons/element (amb fonts multielementals) | 1-60 elements/min | Tots els elements en < 1 min |
| Rang dinàmic | | 10 ³ | 10 ⁶ | 10 ⁸ |
| Precisió | | 0,1-10 % | 0,1-5 % | 0,5-4 % |
| Interferències | Espectrals | Molt poques | Força | Poques |
| | Químiques (matriu) | Força | Molt poques | Algunes |
| | Físiques (matriu) | Algunes | Molt poques | Algunes |
| Total sòlids dissolts | | 0,5-5 % | 0,1-20 % | 0,1-0,4 % |
| Elements analitzables | | 68+ | 73 | 82 |
| Volum mostra requerit | | Gran | Mitjà | Molt poc-mitjà |
| Anàlisi semi-quantitativa | | No | Sí | Sí |
| Anàlisi isotòpica | | No | No | Sí |
| Habilitat de l'operador | | Baixa | Mitjana | Mitjana-alta |
| Cost equipament | | Baix | Alt | Molt alt |
| Nivell d'automatització | | Baix | Alt | Alt |
| Cost per anàlisi | Gran volum, pocs elements | Baix | Mitjà | Mitjà |
| | Gran volum, molts elements | Mitjà | Baix-mitjà | Baix-mitjà |

1.5. MESCLES DE CONTAMINANTS: PAHs i HM

Des de fa anys s'han invertit molts esforços en el desenvolupament del coneixement relacionat amb els PAHs i dels HM (metodologies analítiques de determinació, estudi de la contaminació influïda per aquests contaminants, riscos per la salut humana i éssers vius), però existeix poca informació de com es comporten els dos grups alhora i quina és la seva interacció, així com la influència que pot tenir un sobre l'altre quan es troben mesclats.

A la naturalesa, els sòls es troben contaminats amb més d'un tipus de compost, entre els quals es poden trobar tant els PAHs com els HM, motiu pel qual és important considerar-los de forma conjunta. Hi ha estudis que s'han focalitzat en esbrinar l'efecte dels HM sobre les comunitats microbianes, com és el cas de Giller *et al.* (1998), els quals van comprovar que la contaminació amb HM podia influir canvis en la mida, composició, creixement i activitat microbiana [208], o Landi *et al.* (2000), els quals conclouïen que els HM podien reduir la disponibilitat del substrat per la respiració dels microorganismes del sòl a través de la formació de complexos amb aquests o causant una toxicitat aguda que conduïa a la mort dels microorganismes [209]. Smejkalova *et al.* (2003) van observar un decreixement en una sèrie de paràmetres mesurats (CFU, formació de biomassa, disminució de l'activitat deshidrogenasa³[210]) en augmentar el contingut en HM [211], i Liao *et al.* (2005) van veure que, en presència de HM, les cèl·lules microbianes incorporaven menys carboni orgànic per dur a terme el seu metabolisme [212]. Tanmateix, certs microorganismes exhibeixen resistència a l'estrès influit pels metalls, els quals els permet sobreviure i, fins i tot, pot arribar a representar un mecanisme eficient pel control de la contaminació amb HM [213]. A partir d'aquestes observacions, tots els autors anteriors indiquen que aquests fenòmens podrien constituir un efecte negatiu en degradació de compostos orgànics, inhibint totalment o parcialment l'activitat enzimàtica de molts microorganismes. Entre d'altres autors, Moreau *et al.* (1999) van conduir un estudi en què estudiaven els HM i PAHs de manera conjunta, orientat a valorar la toxicitat de la mescla Zn/Phe en comparació a les dues espècies de forma individual. Van comprovar que, en funció de la relació dels dos contaminants, l'efecte de toxicitat podia adquirir una naturalesa sinèrgica o antagònica, és a dir, que en funció de la proporció HM/PAH, la toxicitat podia incrementar o disminuir, i semblava que la presència de Phe reduïa l'acumulació a curt termini del Zn, prevalent un antagonisme entre els dos contaminants [214]. Shen *et al.* (2005) va estudiar la interacció entre HM (Cd, Zn i Pb) i PAHs (Phe, Fluo, BaP) i l'efecte que produïa sobre l'activitat de dos enzims (ureasa i deshidrogenasa), observant diferents sensibilitats d'aquests en funció del temps d'incubació i, per tant, d'exposició. Va comprovar que, amb el pas del temps, l'activitat anava en augment, la qual cosa suggeria que els microorganismes posseïen una certa tolerància als HM i PAHs i sofrien una etapa inicial d'adaptació. Comentava que a mesura que el sòl envellia, l'adsorció dels contaminants augmentava i, per tant, la seva biodisponibilitat disminuïa, motiu pel qual es recuperava l'activitat enzimàtica [215,216].

³ La mesura de l'activitat deshidrogenasa en sòls esta relacionada amb la respiració microbiana, motiu pel qual s'ha utilitzat extensivament com a indicador de l'activitat microbiana.

Sobre la degradació dels PAHs en presència de HM, els primers passos es van donar per Fualkowska *et al.* (1998), els quals van observar que l'espècie *Rhodococcus equi* podia degradar l'Anth fins un 70 % mentre que, en presència de Pb, es veia un efecte inhibitor absolut. També van comprovar que en absència de HM, existia una fase latent durant les primeres 24 h, durant la qual els microorganismes patien una fase d'adaptació com a resposta a l'estrès influït pels contaminants orgànics, a partir de la qual començava la seva degradació [217]. A aquests autors els van seguir Sokhn *et al.* (2001), que van estudiar la degradació del Phe en presència de Cu (0-7000 ppm) al llarg de 28 dies, veient un clar decreixement en la quantitat de bacteris als nivells superiors de Cu. Aquesta disminució era el resultat tant de la reducció de l'activitat enzimàtica a causa de la toxicitat directa del Cu a nivell cel·lular com de la inhibició de certs enzims a causa dels intermedis formats al llarg de la degradació del Phe [218]. Tanmateix, tots aquests autors estudiaven la degradació dels PAHs en presència de metalls en condicions *in vitro* i no sobre mostres de sòls directament. En canvi, Baldrian *et al.* (2000), van estudiar l'efecte del Cd (0-500 ppm) i del Hg (0-100 ppm), per separat, en la degradació d'una mescla de 8 PAHs (Pyr, BaA, Chr, BaF, BkF, BaP, DB(a,h)A i B(g,h,i)P), en sòls, per l'acció de fongs, i van observar diferències significatives entre els experiments. Van comprovar com pel cas del Pyr i BaA, el percentatge de degradació disminuïa a mesura que augmentava la quantitat de Cd o de Hg, mentre que pels demás PAHs no es produïen degradacions majors del 20 % ni en absència de metalls ni després de l'addició d'altres concentracions de metalls [219]. Per altra banda, Khan *et al.* (2009) van seguir la degradació del Pyr en presència i absència de Pb en sòls per part de comunitats bacterianes. Al cap de 18 setmanes van observar una degradació del 59% pel Pyr (sense el Pb) i del 69% per la mescla Pyr/Pb, i van comprovar que existia un efecte important sobre el nombre de fongs en introduir els contaminants al medi. En aquest estudi, doncs, es presentava un augment de biodegradació com a resultat de la interacció entre els HM i PAHs que, segons els autors, era fortament dependent del tipus i concentració de les dues classes de contaminants presents [220]. En la mateixa línia aplicada a les aigües, Ke *et al.* (2010) van observar que l'exposició d'una certa alga als HM influenciava significativament les interaccions entre les cèl·lules i els PAHs i van veure que aquest impacte era dependent del PAH. Van comprovar que pels PAHs de baix pes molecular (Phe, Flu) tant l'addició com el temps d'exposició als HM (Cd, Zn, Cu i Ni) produïa un efecte positiu en la degradació d'aquests, fins un 99 i 89 %, respectivament, mentre que pels PAHs d'alt pes molecular (Fluo, Pyr i BaP) no s'observava cap efecte dels metalls en l'eficiència de degradació [221].

A l'actualitat més immediata, els estudis de la interacció d'aquests dos contaminants segueix sent d'alt interès. Quant als estudis de la toxicitat com a resultat de la interacció d'aquests contaminants, recentment, Thavamani *et al.* (2012) han publicat una investigació en què utilitzen una combinació de mètodes fisicoquímics, biològics i moleculars per determinar les activitats microbianes de sòls d'una planta de producció de gas, altament contaminada amb HM i PAHs. Han arribat a la conclusió que la presència de HM no només redueix la diversitat de la població microbiana sinó que exerceix una pressió selectiva cap a certes espècies, amb importants conseqüències en tasques de bioremediació. També han observat que la mescla dels dos tipus de contaminants influeix un major estrès i toxicitat en les poblacions microbianes que aquelles mostres de sòl amb alta presència de PAHs però poca de HM [222].

Quant a la degradació dels PAHs en presència de HM, darrerament, Obuekwe *et al.* (2013) han aportat un estudi sobre la degradació del Phe en presència de Zn i Cu, per separat, al llarg de 60 dies, on han comprovat que la presència de Zn a un interval de concentracions de 50-1000 mg·kg⁻¹ i la de Cu a 50-100 mg·kg⁻¹ no exerceix un efecte significatiu en el metabolisme del Phe, mentre que, a majors concentracions de Cu, tant el percentatge de degradació com el nombre de microorganismes presents al sòl decreixen [223].

Com es pot comprovar, existeix molta variabilitat entre els estudis citats, provocat per la poca uniformitat i la gran quantitat d'escenaris explorats: (i) PAHs individuals en presència de HM individuals, (ii) PAHs individuals amb certes mescles de HM, (iii) certes mescles de PAHs en presència de HM individuals, (iv) certes mescles de PAHs amb certes mescles de HM, (v) totes les combinacions anteriors en medis diferents (cultius *in vitro*, aigües, sòls), (vi) estudis amb diferents tipus de microorganismes com bacteris, algues i fongs, (vii) estudis a concentracions de contaminants, sovint, molt diferents. És normal, doncs, que la diferència entre els efectes observats en cadascun dels casos pugui semblar contradictòria però, en tot cas, és important definir bé el sistema sota estudi, no només per interpretar correctament les observacions realitzades, sinó també per establir comparacions rigoroses amb altres investigacions de característiques similars.

Per últim, cal remarcar que també és interessant estudiar tots aquests processos mitjançant la utilització de mostres ambientals enlloc de fer-ho en condicions *in vitro*, per tal d'incloure les

possibles interaccions amb la matriu d'estudi (per exemple, en sòls, la presència d'àcids húmics i fúlvics) i amb els altres tipus de contaminants presents al medi.

1.6. PRESA DE MOSTRA

La presa de mostra és l'acció d'aïllar una porció d'una entitat major abans de la seva anàlisi per descriure'n les característiques de l'entitat completa. És una etapa fonamental en un procediment experimental complet ja que és una font potencial d'introducció de variabilitat en els resultats de les anàlisis. De fet, les tècniques instrumentals o les metodologies d'anàlisi són molt exactes i precises, però els resultats de les anàlisis ambientals no. Molt sovint, s'ha observat que mostres extretes de llocs propers poden no ser membres de la mateixa família, ja que les característiques de les mostres poden canviar de manera gradual al llarg de la zona de la qual s'extreu. Per això a l'hora de dur a terme una presa de mostra cal tenir clars els objectius per la qual es porta a terme, les característiques de la zona explorada i el procediment que s'adoptarà [224].

A la Figura 20 es planteja el possible esquema general d'un procediment experimental complet, incloent la presa de mostra, els aspectes més rellevants de la qual es llisten a continuació [224,225,226,227]:

- ✓ **Objectius de la presa de mostra, identificació de l'adequació de la mostra**

- ✓ **Descripció de la zona de presa de mostra**
 - Situació de l'àrea de presa de mostra, pot ser fixada mitjançant l'ús d'un GPS.
 - Com es troba rodejada: vegetació, rierols, indústria, poblacions, etc.
 - Climatologia: exposada a altes/baixes temperatures, a la llum solar, a pluges, a fenòmens sísmics, etc.
 - Quines són les potencials activitats de caràcter antropogènic i al llarg de quant temps: activitats de lleure (pesca, senderisme), activitats industrials (abocament de residus), activitats de manteniment (tasques de poda, reg, etc.).
 - Accessibilitat al terreny pels humans, vehicles, etc.

✓ **Descripció de les accions de la presa de mostra**

- *Mida de la mostra*: vindrà determinada per la quantitat de mostra necessària per l'anàlisi, els tipus de components que s'hagin d'analitzar així com la precisió i exactitud desitjada en l'anàlisi. Es poden prendre mostres per duplicat de la mateixa localització per comprovar l'exactitud i precisió de les metodologies analítiques. La mida de la mostra també es veurà determinada pel tipus de contenidor al qual es conservarà.
- *Estratègia de presa de mostra*: inclou la definició del nombre de mostres, l'abast de la zona de presa de mostra, la profunditat, la distància entre mostres, el grau d'aleatorietat o de sistematització, etc., amb l'objectiu d'assegurar un alt grau de representativitat.
- *Mesures preventives de seguretat i control de contaminació*: inclou els protocols de protecció de la persona o de l'equip que porta a terme el procediment de presa de mostra (guants, ulleres, vestimenta) i de la descripció del material utilitzat (estèril, protegit amb materials aïllants, etc.).
- *Eines d'extracció i poliment*: raspalls de niló, pales, barrines, etc. La selecció es farà en funció de les necessitats de la presa de mostra segons la profunditat buscada, les característiques del sòl (sequedat, humitat), els objectius d'estudi, la minimització de l'impacte influït a la mostra, la quantitat de mostra necessària, l'accessibilitat al terreny, etc.
- *Transport i conservació*: definició del tipus i de la mida del recipient contenidor (plàstic, vidre, roba, paper) i de les mesures de protecció adoptades per evitar la seva contaminació (aïllament del contacte amb la llum solar, calor, humitat, etc.) i la seva descomposició (refrigeració), etc.
- *Cadena de custòdia*: és important aplicar-la des del moment de l'obtenció de la mostra fins la seva anàlisi. És un seguiment de la mostra per tal de tenir-ne un control sobre el seu estat (d'on s'ha extret, qui i com ha estat manipulada, temps durant el qual ha estat conservada, ruta de transport seguida, etc.) Proporciona una mesura de l'autenticitat de la mostra i ajuda a la prevenció de la contaminació i la identificació de desviacions o irregularitats des del moment de la recollida fins la seva anàlisi.

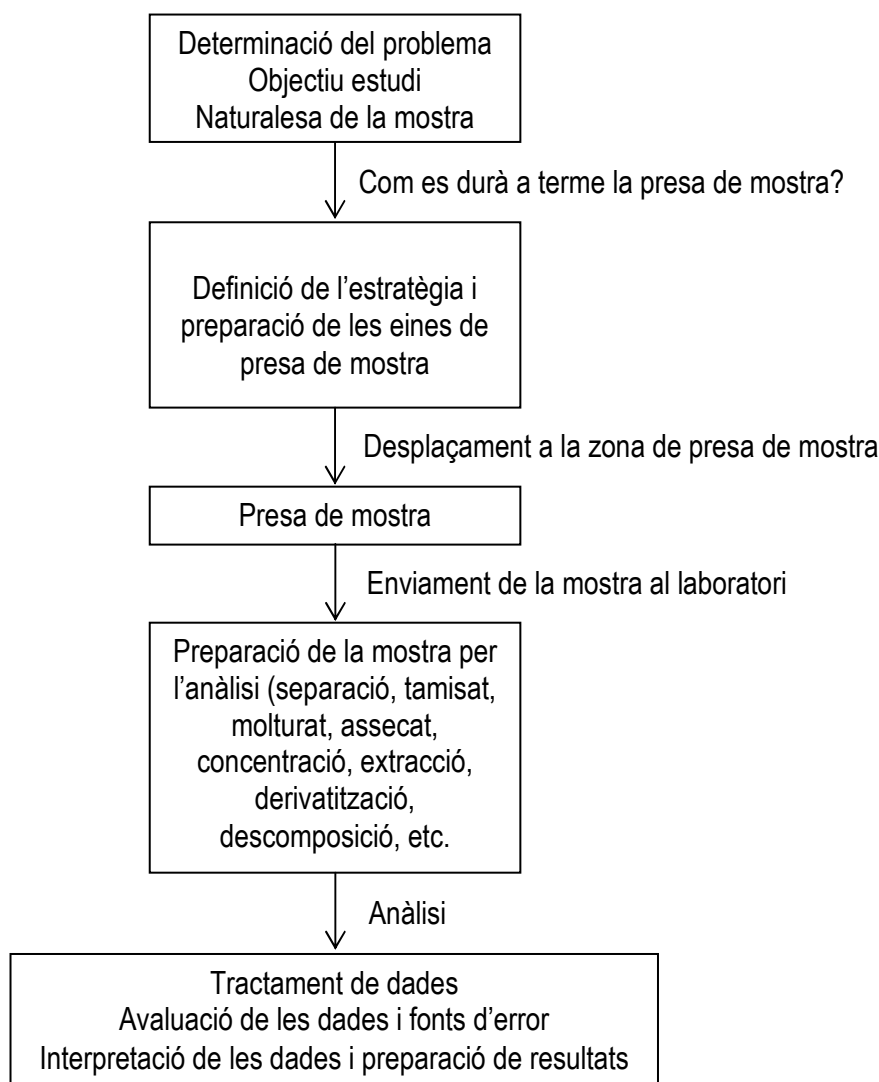


Figura 20. Etapes fonamentals durant el procediment de presa de mostra [224]

1.6.1. ESTRATÈGIES DE PRESA DE MOSTRA

A nivell genèric existeixen dues estratègies de presa de mostra, l'aleatòria o probabilística i la qualificada o orientada. A la primera, la mostra escollida es determina per mètode probabilístic, on l'atzar intervé de manera significativa. A la segona, la presa de mostra es realitza en base a l'avaluació d'un grup d'experts segons els seus coneixements en la matèria. Les dues estratègies de presa de mostra porten un error associat, anomenat biaix en la presa de mostra orientada, degut al propi criteri o judici en el disseny de la presa de mostra que realitza l'expert o el grup d'avaluació. A la presa de mostra aleatòria, l'error que es genera és probabilístic i, per tant, pot ser determinat pels mètodes estadístics pertinents. Això fa que aquest darrer mètode sigui el més utilitzat i el considerat més fiable en el camp de la ciència. A continuació es detallen breument els tipus de presa de mostra aleatòria més populars.

PRESA DE MOSTRA ALEATÒRIA SIMPLE

És la més senzilla i se sol aplicar quan es coneix que la presència del contaminant estudiat és homogènia. Es caracteritza perquè tots els punts del terreny tenen la mateixa probabilitat de ser escollits. Primerament s'associa un símbol o unes coordenades a cada punt del terreny, a continuació es determinen quins seran els punts escollits mitjançant un mètode de sorteig i, finalment, es procedeix a l'extracció de les mostres seleccionades (Figura 21) [225,226,227].

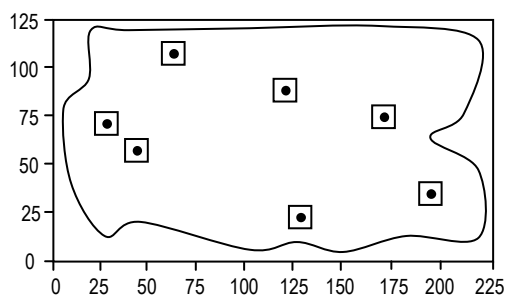


Figura 21. Distribució de punts d'una presa de mostra aleatòria simple

PRESA DE MOSTRA ALEATÒRIA ESTRATIFICADA

Aquest tipus de presa de mostra s'aplica a terrenys on la distribució del contaminant és heterogènia, degut a una varietat de factors (menor o major presència de contaminants, pendent del terreny, etc.). Aquesta variabilitat ha de ser reconeguda mitjançant una divisió del terreny en subgrups anomenats estrats. Cada estrat tindrà unes característiques homogènies a la vegada que es diferenciarà dels altres estrats. És a dir, la varietat intra-estrats és molt menor que la que es presenta inter-estrats. Aleshores, es procedeix a extreure les mostres de cada estrat mitjançant una presa de mostra aleatòria simple independent entre estrats. Caldrà tenir en compte el percentatge d'espai que ocupi cada estrat. Per exemple, si un terreny es divideix en 3 estrats i un d'ells avarca el 50 %, un altre el 30 % i el darrer el 20 %, i es volen extreure 10 mostres, 5 hauran de ser del primer estrat, 3 del segon i 2 del tercer. Aquesta és la manera d'assegurar una major representativitat en la presa de mostra del sòl estudiat (Figura 22) [225,226,227].

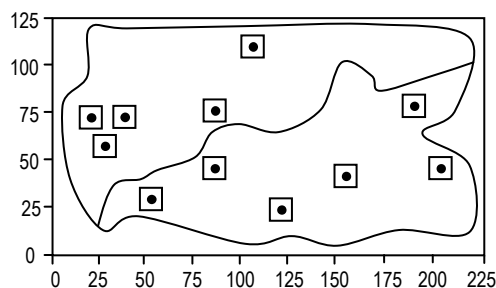


Figura 22. Distribució de punts d'una presa de mostra aleatòria estratificada

PRESA DE MOSTRA SISTEMÀTICA

En aquest tipus de presa de mostra, la distància entre els diferents punts d'extracció ha de ser fixa respecte el primer punt de presa de mostra aleatòria. Tota la resta de punts s'escullen en funció d'aquest, per exemple, fixant 1 m entre les diferents extraccions en format quadrícula (Figura 23a), zig-zag (Figura 23b) o diagonal (Figura 23c). Aquest tipus de presa de mostra resulta útil quan no es té coneixement sobre la distribució del contaminant al sòl i no se sap si hi ha homogeneïtat o heterogeneïtat en la distribució del contaminant. Així doncs, aquest mètode és el més útil per a realitzar estudis preliminars per a conèixer les característiques del sòl on posteriorment s'efectuarà la presa de mostra definitiva [225,226,227].

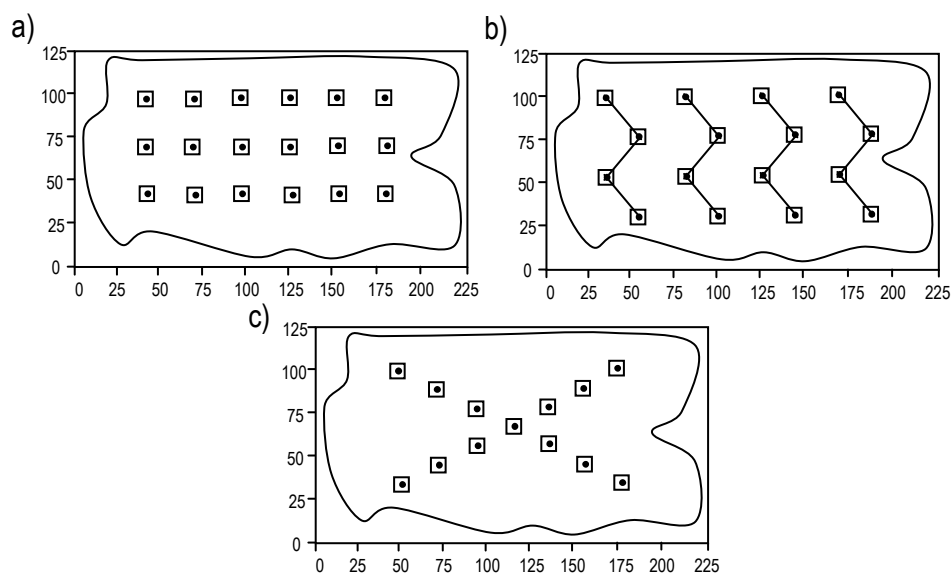


Figura 23. Distribució de punts en tres estratègies diferents de presa de mostra aleatòria sistemàtica (a) quadrícula, (b) zig-zag, (c) diagonal

PRESA DE MOSTRA COMPOSTA

Aquest procediment consisteix en l'extracció de diverses mostres combinant els dos mètodes de presa de mostra anteriors (aleatòria estratificada i sistemàtica) que, posteriorment, es mesclen per a formar una mostra única. Combina els avantatges de l'augment de precisió per la divisió de les zones de la presa de mostra en estrats i els avantatges en termes de desconeixement de la distribució del contaminant de la presa de mostra sistemàtica (Figura 24) [225,226,227].

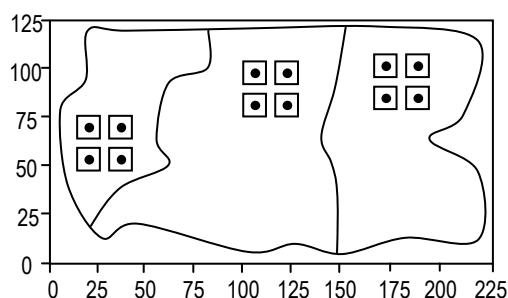


Figura 24. Distribució de punts d'una presa de mostra composta

Sigui quin sigui el mètode seguit, cal recordar que aquest només es un dels paràmetres a tenir en compte a l'hora de dur a terme una presa de mostra i que les demás fonts de variabilitat (manipulació, transport, emmagatzemament, etc.) hauran de ser cuidadosament valorades per tal de minimitzar la introducció d'errors. Aquests errors poden acabar reflectint-se al final de les anàlisis i conduir a interpretacions o jutjaments incorrectes de les dades obtingudes.

1.7. CARACTERITZACIÓ DE LES MOSTRES

1.7.1. HUMITAT

Les variacions periòdiques de la humitat del sòl poden alterar les propietats biològiques i fisicoquímiques d'aquest, la qual cosa pot afectar a la distribució dels contaminants. Els cicles d'humitejat i assecat que tenen lloc al sòl poden influir en la mobilitat dels contaminants, quan es troben complexats amb el carboni orgànic dissolt (DOC) o units a partícules col·loïdals. El DOC en la dissolució del sòl augmenta al principi del cicle d'humitejat, després de períodes de sequedat, la qual cosa suggereix que l'activitat microbiana responsable de la descomposició de la matèria orgànica dissolta es veu reduïda durant aquesta darrera etapa [228]. En zones amb baixa quantitat d'aigua, les variacions de la humitat del sòl poden tenir un efecte important en la

difusió dels substrats solubles, mentre que a zones amb alta humitat, la difusió de l'oxigen es pot acabar veient impedida, factors limitants per la respiració microbiana [229].

1.7.2. pH

La determinació del pH d'un medi és essencial ja que pot afectar directament a la mobilitat i la disponibilitat d'elements essencials, l'activitat dels microorganismes del sòl, la solubilitat d'elements potencialment tòxics, pot induir toxicitat sobre els éssers vius presents i pot afavorir la competitivitat entre les espècies existents. Els sòls es poden classificar en funció de la seva acidesa segons es mostra a la Taula 11.

Taula 11. Classificació del sòl en funció de la seva acidesa [230]

| Rang pH | Grau d'acidesa | Processos químics |
|---------|---------------------|---|
| <4,5 | Extremadament àcid | Presència d'àcid lliure, de l'oxidació de sulfits a H ₂ SO ₄ |
| 4-5,5 | Fortament àcid | Alumini intercanviable, grups àcids de matèria orgànica en major procés d'humificació; hidròlisi de CO ₂ a HCO ₃ ⁻ |
| 5,5-6,5 | Moderadament àcid | grups àcids de matèria orgànica en major procés d'humificació; reacció del H ₂ CO ₃ ; sals bàsiques de sulfat d'alumini |
| 6,5-7,5 | Neutre | |
| 7,5-8,5 | Moderadament bàsic | Ca(HCO ₃) ₂ i Mg(HCO ₃) ₂ |
| 8,5-9,8 | Fortament bàsic | |
| 10-11 | Extremadament bàsic | Sòls sòdics, excés de Na ⁺ |

1.7.3. CONDUCTIVITAT ELÈCTRICA

La conductivitat elèctrica (EC) és una mesura del corrent elèctric generat pels ions que es troben en solució aquosa. Al sòl, aquests ions provenen de tot tipus de salts dissoltes en l'aigua del sòl, els quals poden ser utilitzats com a nutrients pels microorganismes i les plantes. Per tant, mesurant l'EC del sòl, es pot tenir una idea de la disponibilitat de nutrients o de les característiques de salinitat del mateix. La quantitat de sòlids totals dissolts en solució (TDS) és directament proporcional a l'EC, però cal tenir en compte que aquesta no només varia en funció

de la quantitat de sals presents sinó que també en funció de la composició química del nutrient [231]. Tanmateix, la mesura de la conductivitat permet classificar els sòls de forma general tal i com es mostra a la Taula 12.

Taula 12. Classificació del sòl en funció de la conductivitat elèctrica (EC) [231]

| EC a 25°C ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) | Tipus de sòl | Efecte |
|--|-------------------|---|
| < 200 | No salí | Efectes de salinitat menyspreables |
| 200-400 | Lleugerament salí | Els cultius molt sensibles poden veure's afectats |
| 400-800 | Moderadament salí | La major part de les plantes es veuen afectades |
| 800-1600 | Salí | Només els cultius tolerants es poden desenvolupar |
| >1600 | Molt salí | Només els cultius molt tolerants sobreviuen |

1.7.4. PERCENTATGE DE CARBONATS

Als sòls es troben diferents fonts primàries i secundàries de carbonats. Les primàries són les que provenen de la descomposició de minerals i les secundàries solen formar-se com a capes superficials procedents de la precipitació d'espècies en solució. Les formes més comunes són la calcita (CaCO_3) i la dolomita ($\text{CaMg}(\text{CO}_3)_2$). Els carbonats actuen com a tampons del pH del medi i són una indicació de l'abundància relativa de la presència de bases. A més, contribueixen a l'estabilització de l'estructura del sòl i de la matèria orgànica existent. La presència de CaCO_3 proporciona una superfície activa per a reaccions d'adsorció i precipitació, com per exemple, de fosfats, metalls pesants i àcids orgànics. Per aquest motiu, la distribució dels carbonats té una influència directa en la fertilitat, la potencialitat d'erosió i la capacitat de retenció d'aigua del medi així com en la mobilitat i disponibilitat de contaminants [232]. A la Taula 13 es presenta la classificació general del sòl en funció del percentatge de carbonats presents.

Taula 13. Classificació del sòl en funció del percentatge de carbonats [233]

| Carbonats (%) | Tipus de sòl | Efecte |
|---------------|-----------------------|---|
| 0 | No calcari | Sòls àcids |
| 0-2 | Lleugerament calcari | Sòls lleugerament àcids |
| 2-10 | Moderadament calcari | Sòls neutres |
| 10-25 | Fortament calcari | Alta capa impermeable, reducció disponibilitat de nutrients, |
| >25 | Extremadament calcari | disminució de la capacitat de retenció d'aigua, sòls més alcalins |

1.7.5. MATÈRIA ORGÀNICA

La matèria orgànica del sòl (OM) es troba constituïda, principalment, de tres parts. La fracció corresponent als residus de plantes i dels microorganismes, la matèria orgànica activa en procés lent de descomposició (éssers vius com plantes i microorganismes) i la matèria orgànica estable o humus, formada pels àcids fúlvics, húmics i substàncies que no s'han degradat al llarg del temps i s'han adherit al sòl, al qual romanen estables [233].

L'OM no només té una influència en la conservació de l'estructura del sòl i de la capacitat de retenció d'aigua d'aquest, sinó que també afecta al pH del medi i als microorganismes que hi habiten. L'OM facilita en gran mesura l'adsorció dels contaminants al sòl però per altra banda també pot conduir a la formació de complexos i quelats provocant la migració dels metalls a través de les diferents capes del sòl. Per tant, té un efecte directe en la mobilitat i biodisponibilitat de certs tipus de contaminants que es pot traduir en un increment o disminució de la toxicitat del sòl pels éssers vius presents a aquest [234]. Els principals factors que poden influir en el contingut d'OM són, per una banda, naturals (climatologia, vegetació, topografia) i antropogènics (ús del sol, degradació, etc.).

Sovint, l'OM al sòl es mesura com a contingut de carboni orgànic (OC) seguint la relació de conversió OC:OM de 1:1,7. La classificació general del sòl en funció del seu contingut en OM es presenta a la Taula 14.

Taula 14. Classificació del sòl en funció dl contingut en matèria orgànica (OM) [235]

| OM (%) | Tipus de sòl | Efecte |
|---------|-----------------|---|
| < 1,0 | Molt baix en OM | Alta velocitat de descomposició, baixa producció de biomassa |
| 1,1-2,0 | Baix en OM | |
| 2,1-6,0 | Moderat en OM | Solt argilós, majors filtracions d'aigua, augment de la capacitat de retenció d'aigua |
| > 6,0 | Alt en OM | pH extrems, augment de la disponibilitat i mobilitat dels contaminants |

1.7.6. CAPACITAT MÀXIMA DE RETENCIÓ D'AIGUA

La capacitat màxima de retenció d'aigua d'un sòl (MWHC) és, tal i com indica el nom, la màxima quantitat d'aigua que un sòl pot emmagatzemar. Inclou l'aigua que es troba a l'interior dels minerals de manera natural, l'aigua gravitacional que es filtra des de la superfície del sòl a través dels porus i els espais entre partícules i l'aigua capil·lar, que és capaç de quedar retinguda als porus en contra de la força de la gravetat. Per tant, la MWHC es veu afectada pel contingut d'OM i per la mida de partícula del sòl ja que depèn, en gran mesura, de l'estructura i compactació d'aquest [236]. La MWHC habitual d'un sòl és entre el 60-80 % de la seva capacitat total, és a dir, que el 60-80 % dels porus del sòl estan plens d'aigua. Aquest percentatge correspon amb el percentatge ideal per a l'òptima activitat biològica dels microorganismes. Els microorganismes poden patir sequedat quan la MWHC < 60 %, i falta d'oxigen al sòl quan la MWHC > 80 %.

1.7.7. METALLS PESANTS

La determinació de la quantitat de metalls presents al sòl és un factor determinant per avaluar l'estat del sòl i per valorar el nivell de contaminació del mateix, tal i com ja s'ha mencionat anteriorment. Es pot determinar el contingut total de metalls a partir de la digestió àcida de la mostra de sòl, tot i que aquest contingut no és estrictament correcte per determinar la perillositat real sobre els éssers vius presents al sòl (plantes, microorganismes, etc.) [237]. Els metalls es poden trobar com a partícules sòlides, formant pel·lícules líquides al voltant d'una partícula així com adsorbits en la superfície d'aquestes o a la seva matriu. També es poden trobar dissolts en

les fases líquides en zones intersticials o en forma sòlida als porus de les partícules. Aquestes diferents possibilitats depenen de l'espècie en què es trobin els metalls i venen determinades per múltiples factors com el pH, el contingut d'OM, el percentatge de carbonats, els ions presents al medi, etc. [9]. Això fa que per tal de valorar la toxicitat potencial de cara als éssers vius presents al sòl, sigui interessant dur a terme estudis d'especiació per tal de conèixer-ne la biodisponibilitat. La biodisponibilitat són aquelles formes dels metalls que es troben accessibles i que són assimilables pels éssers vius pel desenvolupament de les seves funcions vitals i del seu metabolisme. Aquestes formes químiques dels metalls són les que poden afectar de manera determinant, per exemple, l'activitat metabòlica de certs microorganismes involucrada en la degradació d'alguns compostos. Per aquest motiu, és important conèixer la biodisponibilitat dels metalls (més enllà del seu contingut total) ja que representa una mesura més estricta per valorar la possible influència que exerceixen els contaminants sobre les formes de vida. La biodisponibilitat dels metalls es pot determinar mitjançant l'aplicació de mètodes d'extraccions simples [238,239,240] i/o mètodes d'extraccions seqüencials [241,242].

1.7.8. DETERMINACIÓ DE LES UNITATS FORMADORES DE COLÒNIES

Les determinació de les unitats formadores de colònies (CFU) proporciona una mesura estimada de les característiques microbiològiques o nombre de poblacions bacterianes existents en un medi determinat. Es realitza mitjançant el creixement de microorganismes en medis de cultiu sintètics que poden ser sòlids, líquids o semi-sòlids, com l'agar. La determinació de les CFU és important ja que representa una oportunitat per avaluar les possibilitats de degradació de compostos orgànics, tot i que les diferents espècies presents poden requerir diferents fonts de carboni per a dur a terme el seu metabolisme. A més, la quantitat de CFU i el tipus de colònies presents és indicatiu de la qualitat del sòl, ja que en sòls sans la varietat d'espècies presents és molt elevada. Aquestes espècies de microorganismes tenen una influència vital en el cicle dels nutrients i l'estructura del sòl. Alguns dels factors que influents en la quantitat de les comunitats bacterianes són la humitat, el pH, la temperatura, la presència de contaminants, el contingut en OM, etc. [243].

1.8. MICROCOSMOS

Els microcosmos són una rèplica del medi natural a escala de laboratori que pretén reproduir de la forma més acurada possible les característiques de la mostra d'estudi sota condicions controlades [244]. La preparació de microcosmos a partir de sòls representen una oportunitat d'estudiar els diferents fenòmens fisicoquímics que hi tenen lloc amb l'avantatge de preservar les característiques originals del medi de treball. D'aquesta manera, es maximitza la conservació de la textura del sòl (argila, llim, sorra), la quantitat d'OM (àcids húmics, fúlvics), les interaccions existents entre els diferents compostos presents, la quantitat de microorganismes, etc. [245]. Aquestes característiques permeten, per exemple, avaluar el grau de degradació de certs compostos al sòl per part dels microorganismes que hi habiten de forma més realista que en incubacions de tipus *in vitro*. També confereixen l'avantatge de poder dur a terme experiments de dopatge amb d'altres substàncies per tal de valorar les possibles interaccions existents entre contaminants de diferent naturalesa [246]. Tot i això, en alguns casos, sovint és necessari un ajust de les condicions d'alguns paràmetres com el pH, la relació C:N:P, etc., per tal de minimitzar els canvis influïts en afegir substàncies al sòl a concentracions no habituals. Tanmateix, la preparació de microcosmos proporciona una oportunitat per estudiar la resposta del medi a una exposició sobtada a certs compostos, la qual pot aparèixer com a resultat d'activitats antropogèniques i poden resultar eventualment contaminants. Al mateix temps, també permet assajar diferents estratègies relacionades amb tasques de remediació i/o bioremediació per l'eliminació de contaminants dels medis, a través de l'addició d'espècies químiques i/o éssers vius (microorganismes, plantes) al mateix [94,95,96].

A l'actualitat, la gran majoria d'autors segueixen diferents estratègies en la preparació de microcosmos en funció de les necessitats i objectius de l'estudi. Aquestes variacions solen incloure diferents mides de microcosmos i tipus de materials emprats en la seva elaboració, cosa que pot representar una font de variabilitat en els resultats obtinguts dins la comunitat científica. Això implica que és extremadament important definir de manera estricta i detallada el procediment seguit en la preparació dels microcosmos. No obstant això, el protocol seguit pel disseny dels microcosmos és cada cop més similar, sobretot, en estudis sobre la mateixa temàtica, ja que és d'interès l'estandardització d'aquesta pràctica de preparació per tal de poder establir comparacions amb les diferents investigacions que es porten a terme (especialment, per grups de recerca diferents). Per exemple, en estudis sobre la capacitat d'alguns

microorganismes per degradar PAHs, és habitual preparar microcosmos de mides entre 25-1000 g de sòl, afegint els compostos d'interès en rangs de concentració entre 100-10000 vegades la concentració determinada al sòl, dissolts en solvent orgànic i afegits a una porció de sòl esterilitzat. La introducció dels PAHs als microcosmos se sol fer sobre una part de sòl esterilitzat per tal d'evitar la mort dels microorganismes durant l'addició de la mescla contaminant. També és comú ajustar la humitat del sòl fins al 60-80 % de la MWHC (considerat el percentatge d'humitat òptim pel desenvolupament de l'activitat microbiana) i procedir a la incubació dels microcosmos protegits de la llum solar, airejant-los de manera controlada [94,95,96,220,247,248,249]. Un esquema a mode d'exemple de les fases de la preparació d'un microcosmos per aquest darrer tipus d'estudis (seguit en aquest treball) es presenta a la Figura 25 (abans d'homogeneïtzar), tot i que no existeix oficialment un protocol estàndard d'elaboració d'aquests.

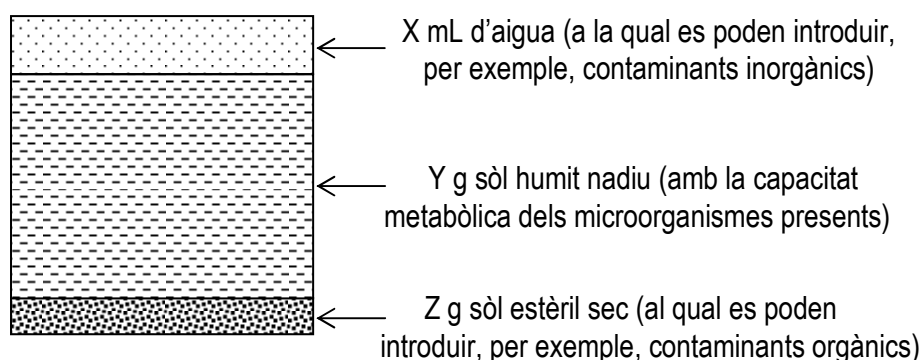


Figura 25. Esquema bàsic de la preparació d'un possible microcosmos

1.9. OBJECTIUS

L'estat de la contaminació dels sòls és una realitat en constant evolució, tal i com s'ha repassat al llarg de la introducció. La determinació analítica de moltes substàncies pel control de la contaminació ambiental es troba en marxa així com l'efecte biològic que poden produir certs grups de contaminants. Ara bé, ha quedat palès que la interacció entre mesclures complexes d'aquests grups de contaminants en matrius complexes com els sòls no ha estat estudiada de forma extensiva, sobretot pel que fa a l'efecte de la presència de mesclures de HM en la degradació dels PAHs. Aquest és un fenomen clau a tenir en compte a l'hora desenvolupar estratègies de remediació de la contaminació al sòl, ja que aquests es troben contaminats amb gran varietat de compostos. Per altra banda, les metodologies analítiques de determinació

d'alguns derivats dels PAHs han captat poca atenció de la comunitat científica en sòls en un moment en què la designació de nous contaminants emergents es troba en augment. Amb aquesta motivació es descriuen a continuació els objectius d'aquesta tesi doctoral:

- ✓ Optimització i establiment d'una metodologia de determinació analítica de PAHs en mostres de sòls: avaluació de diferents mètodes d'extracció (Soxhlet, MAE), purificació (cromatografia en columna, SPE) i anàlisi instrumental (GC/MS). Estudi de la influència del pretractament de mostra (tamisat i molturat) en la determinació de la concentració de PAHs en mostres de sòls.
- ✓ Desenvolupament d'una nova metodologia d'anàlisi d'OH-PAHs en sòls mitjançant la utilització de la purificació selectiva basada en polímers impremtats molecularment (MIPs) amb l'objectiu de millorar la sensibilitat, disminuir el temps d'anàlisi i de pretractament de la mostra requerit per les poques metodologies existents.
- ✓ Estudi de l'efecte de les mescles de contaminants: influència dels metalls pesants en el procés de degradació dels PAHs en microcosmos preparats a partir d'una mostra de sòl. Aplicació de les metodologies anteriorment mencionades a l'anàlisi de PAHs i OH-PAHs als microcosmos.

1.10. BIBLIOGRAFIA

- [1] E. Nielsen, G. Ostergaard, J. C. Larsen, Toxicological Risk Assessment of Chemicals, Ed. Informa Healthcare (2008), Nova York, Estats Units.
- [2] D. Harvey, Modern Analytical Chemistry, Ed. McGraw-Hill (2000), Nova York, Estats Units.
- [3] P. Patnaik, Handbook of Environmental Analysis, Ed. CRC Press (2010), Boca Raton, Estats Units.
- [4] Office of Environment and Heritage, What effects air quality?, http://www.cleartheair.nsw.gov.au/science_and_research/cause_and_effect/what_effects_air_quality.aspx [En línia], Juliol 2013.
- [5] P. Vowell, Aqua Cycle, http://aquacycle.blogspot.com.es/2010_07_01_archive.html [En línia], Juliol 2013.
- [6] A. I. R. Fernandez, Contaminación de suelos por metales pesados, http://www.infoagro.com/abonos/contaminacion_suelos_metales_pesados.htm [En línia], Juliol 2013.
- [7] European Environment Agency (EEA), Progress in management of contaminated sites (CSI 015), <http://www.eea.europa.eu/data-and-maps/indicators/progress-in-management-of-contaminated-sites/progress-in-management-of-contaminated-1> [En línia], Juliol 2013.
- [8] K. T. Semple, B. J. Reid, T. R. Fermor, Environ. Pollut., 112 (2001) 269.
- [9] E. G. Huertos, A. R. Baena, Macla, 10 (2008) 48.
- [9] ATSDR Agency for Toxic Substances & Disease Registry, Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): What are Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)?, <http://www.atsdr.cdc.gov/csem/pah/pah.html> [En línia], Juliol 2010.
- [11] United States Environmental Protection Agency (US EPA), Laws and Regulations, <http://www.epa.gov/lawsregs/> [En línia], Juliol 2010.
- [12] D. Benford, A. Agudo, C. Carrington, T. Hambridge, R. van Leeuwen, M. Rao, W. Slob, M. C. Figueiredo Toledo, R. Walker. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Evaluation of certain food contaminants, JECFA meeting (2005), Ginebra, Suïssa.
- [13] Polynuclear aromatic hydrocarbons (PAH). A: Air quality guidelines for Europe, Ed. WHO Regional Office for Europe (2000), Copenhagen, Dinamarca.
- [14] Y. W. F. Tham, K. Takeda, H. Sakugawa, Water Air Soil Poll., 194 (2008) 5.
- [15] G. L. Brun, O. C. Vaidya, M. G. Léger, Environ. Sci. Technol., 38 (2004) 1941.
- [16] European Environment Agency (EEA), European Union emission inventory report under the United Nations Economic Commission for Europe (UNECE) Convention on Long-range

-
- Transboundary Air Pollution (LRTAP), Technical Report 9/2011, <http://www.eea.europa.eu/publications/eu-emission-inventory-report-1990-2009> [En línia], Febrer 2013.
- [17] G. Falcó, J. L. Domingo, J. M. Llobet, A. Teixidó, C. Casas, L. Müller, J. Food Protect., 12 (2003) 2325.
- [18] M. Nadal, M. Schuhmacher, J. L. Domingo, Environ. Pollut., 132 (2004) 1.
- [19] M. Malawska, B. Wilkomrski, Water Air Soil Poll., 127 (2001) 339.
- [20] B. Ma, H. Chen, Y. He, H. Wang, J. Xu, J. Soil. Sediment., 10 (2010) 955.
- [21] F. L. Xu, W. J. Wu, J. J. Wang, N. Qin, Y. Wang, Q. S. He, W. He, S. Tao, Ecol. Model., 222 (2011) 275.
- [22] IARC International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, <http://www.iarc.fr/> [En línia], Agost 2010.
- [23] Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME), Canadian Soil Quality Guidelines for Carcinogenic and Other Polycyclic Aromatic Hydrocarbons, Scientific Supporting Document (2008).
- [24] X. X. Zhang, S. P. Cheng, J. C. Zhu, S. L. Sun, Pedosphere, 16 (2006) 555.
- [25] K. Clive, K. Wadhia, A. Loibner, Environmental Toxicity Testing, Ed. Blackwell Publishing Ltd. (2005), Oxford, Regne Unit.
- [26] United States Environmental Protection Agency (US EPA), Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), <http://www.epa.gov/wastes/hazard/wastemin/minimize/factshts/pahs.pdf> [En línia], Febrer 2013.
- [27] S. Christie, D. Raper, D. S. Lee, P. I. Williams, L. Rye, S. Blakey, C. W. Wilson, P. Lobo, D. Hagen, P. D. Whitefield, Environ. Sci. Technol., 46 (2012) 6393.
- [28] N. Gibson, R. Stewart, E. Rankin, J. Environ. Monit., 14 (2012) 233.
- [29] P. Rossner Jr., A. Rossnerova, M. Spatova, O. Beskid, K. Uhlírova, H. Libalova, I. Solansky, J. Topinka, R. J. Sram, Mutagenesis, 28 (2013) 97.
- [30] United Nations Economic Commission for Europe (UNECE), Convention on Long-Range Transboundary Air Pollution, http://treaties.un.org/Treaties/1991/02/1991021405-04PM/ChXXVI_01_cp.pdf [En línia], Febrer 2013.
- [31] Economic Commission for Europe, Aarhus Protocol on Persistent Organic Pollutants, http://unece.org/fileadmin/DAM/env/lrtap/full_text/1998.POPs.e.pdf [En línia], Febrer 2013.
- [32] The European Parliament and The Council of the European Union, Regulation (EC) 850/2004, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:158:0007:0049:EN:PDF> [En línia], Febrer 2013.

- [33] Economic Commission for Europe, ECE/EB.AIR/99/Add.1, <http://unece.org/fileadmin/DAM/env/lrtap/fulltext/ece.eb.air.104.e.pdf> [En línia], Febrer 2013.
- [34] The Council of the European Union, Directive 96/62/EC, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31996L0062:EN:HTML> [En línia], Febrer 2013.
- [35] The Commission of the European Communities, Decision 2001/752/EC, <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:32001D0752:EN:HTML> [En línia], Febrer 2013.
- [36] The European Parliament and The Council of the European Union, Directive 2008/50/EC, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2008:152:0001:0044:EN:PDF> [En línia], Febrer 2013.
- [37] The European Parliament and The Council of the European Union, Directive 2004/107/EC, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2004L0107:20090420:EN:PDF> [En línia], Febrer 2013.
- [38] European Environment Agency (EEA), The European Pollutant Emission Register (EPER), <http://eea.europa.eu/data-and-maps/data/eper-the-european-pollutant-emission-register-3> [En línia], Febrer 2003.
- [39] The European Parliament and The Council of the European Union, Directive 2000/60/EC, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2000:327:0001:0072:EN:PDF> [En línia], Febrer 2013.
- [40] The European Parliament and The Council of the European Union, Decision 2455/2001/EC, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2001:331:0001:0005:EN:PDF> [En línia], Febrer 2013.
- [41] The Council of the European Union, Directive 98/83/EC, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1998:330:0032:0054:EN:PDF> [En línia], Febrer 2013.
- [42] The Commission of the European Communities, Regulation (EC) 1881/2006, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2006:364:0005:0024:EN:PDF> [En línia], Febrer 2013.
- [43] The Commission of the European Communities, EC 333/2007, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:088:0029:0038:EN:PDF> [En línia], Febrer 2013.
- [44] Gobierno de España, Real Decreto 9/2005, <http://www.boe.es/boe/dias/2005/01/18/pdfs/A01833-01843.pdf> [En línia], Agost 2010.
- [45] Gobierno de España, Ley 22/2011, <http://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2011-13046> [En línia], Agost 2010.
- [46] I. N. Nasr, M. H. Arief, A.1 2 3 H. Abdel-Aleem, F. M. Malhat, J. Appl. Sci. Res., 6 (2010) 13.

- [47] X. Liu, H. Jia, L. Wang, H. Qi, W. Ma, W. Hong, J. Guo, M. Yang, Y. Sun, Y. F. Li, *Ecotox. Environ. Safe.*, 90 (2013) 151.
- [48] C. Erger, P. Balsaa, F. Werres, C. T. Schmidt, *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (2013) 5215.
- [49] Z. Li, E. N. Pittman, D. A. Trinidad, L. C. Romanoff, J. Mulholland, A. Sjödin, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396 (2010) 1321.
- [50] N. C. Deziel, W. Q. Wei, C.C. Abnet, Y. L. Qiao, D. Sunderland, J. S. Ren, M. M. Schantz, Y. Zhang, P. T. Strickland, S. Abubaker, S. M. Dawsey, M. C. Friesen, M. J. Roth, *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.*, 23 (2013) 52.
- [51] G. V. Martins, S. Martins, A. O. Martins, M. C. P. Basto, G. V. Silva, *Environ. Monit. Assess.*, 185 (2013) 6447.
- [52] X. T. Wang, Y. Miao, Y. Zhang, Y. C. Li, M. H. Wu, G. Yu, *Sci. Total Environ.*, 447 (2013) 80.
- [53] S. M. Rhind, C. E. Kyle, C. Kerr, M. Osprey, Z. L. Zhang, E. I. Duff, A. Lilly, A. Nolan, G. Hudson, W. Towers, *Environ. Pollut.*, 182 (2013) 15.
- [54] M. Wyszowski, A. Ziolkowska, *Plant Soil Environ.*, 59 (2013) 287.
- [55] O. E. Oyo-lta, I. O. Oyo-lta, S. U. Ugim, *Environ. Monit. Assess.*, 185 (2013) 1413.
- [56] A. Ishizaki, K. Saito, N. Hanioka, S. Narimatsu, H. Kataoka, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 5555.
- [57] P. Plaza-Bolanos, A. G. Frenich, J. L. M. Vidal, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 6303.
- [58] M. J. Ramalhosa, P. Paiga, S. Morais, A. M. M. Sousa, M. P. Gonçalves, C. Delerue-Matos, M. B. P. P. Oliveira, *Food Chem.*, 135 (2012) 234.
- [59] B. Veyrand, V. Sirot, S. Durand, C. Pollono, P. Marchand, G. Dervilly-Pinel, A. Tard, J. C. Leblanc, B. Le Bizec, *Environ. Int.*, 54 (2013) 11.
- [60] L. Campo, R. Mercadante, F. Rosella, S. Fustinoni, *Anal. Chim. Acta*, 631 (2009) 196.
- [61] J. D. Pleil, M. A. Stiegel, J. R. Sobus, S. Tabucchi, A. J. Ghio, M. C. Madden, *J. Chromatogr. B*, 878 (2010) 1753.
- [62] H. Hagenmaier, H. Kaut, P. Krauss, *Int. J. Environ. Anal. Chem.*, 23 (1986) 331.
- [63] J. X. Zhang, Y. W. Yu, M. Yang, H. J. Zhang, Q. Zhang, J. P. Chen, *J. Environ. Sci. Health*, 43 (2008) 375.
- [64] D. Fabbri, A. G. Rombola, C. Torri, K. A. Spokas, *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 103 (2013) 60.
- [65] N. Ratola, S. Lacorte, A. Alves, D. Barceló, *J. Chromatogr. A*, 1114 (2006) 198.
- [66] E. Morillo, A. S. Romero, C. Maqueta, L. Madrid, F. Ajmone-Marsan, H. German, C. M. Davidson, A.S. Hursthouse, J. Villaverde, *J. Environ. Monit.*, 9 (2007) 1001.

- [67] F. Yang, Y. Long, R. Shen, C. Chen, D. Pan, Q. Zhang, Q. Cai, S. Yao, *J. Sep. Sci.*, 34 (2011) 716.
- [68] N. Barco-Bonilla, J. L. M. Vidal, A. Garrido-Frenich, R. Romero-Gonzalez, *Talanta*, 78 (2009) 156.
- [69] P. Lehnik-Habrink, S. Hein, T. Win, W. Bremser, I. Nehls, *J. Soil. Sediment.*, 10 (2010) 1487.
- [70] Y. Zhang, G. L. Shi, C. S. Guo, J. Xu, Y. Z. Tian, Y. C. Feng, Y. Q. Wang, *J. Soil. Sediment.*, 12 (2012) 933.
- [71] M. Y. Ali, R. B. Cole, *Anal. Bioanal. Chem.*, 374 (2002) 923.
- [72] L. Lojkova, J. Sedlakova, V. Kuban, *J. Sep. Sci.*, 28 (2005) 2067.
- [73] L. Bielska, K. Smidova, J. Hofman, *Environ. Pollut.*, 176 (2013) 48.
- [74] W. Wang, B. Meng, X. Lu, Y. Liu, S. Tao, *Anal. Chim. Acta*, 602 (2007) 211.
- [75] A. Ene, O. Bogdevich, A. Sion, T. Spanos, *Microchem. J.*, 100 (2012) 36.
- [76] P. Sibiya, L. Chimuka, E. Cukrowska, H. Tutu, *Environ. Monit. Assess.*, 185 (2013) 5537.
- [77] J. R. Dean, G. Xiong, *Trend. Anal. Chem.*, 19 (2000) 553.
- [78] G. Ouyang, J. Pawliszyn, *Trend. Anal. Chem.*, 25 (2006) 692.
- [79] M. Eriksson, J. Faldt, G. Dalhammar, A. K. Borg-Karlson, *Chemosphere*, 44 (2001) 1641.
- [80] P. Tsytsik, J. Czech, R. Carleer, *J. Chromatogr. A*, 1210 (2008) 212.
- [81] B. L. Van Drooge, I. Nikolova, P. P. Ballesta, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 4030.
- [82] S. Bucu, M. Moragues, P. Doumenq, A. Noor, G. Mille, *J. Chromatogr. A*, 1026 (2004) 223.
- [83] M. Gfrerer, M. Serschen, E. Lankmayr, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 53 (2002) 203.
- [84] S. Froehner, L. F. Dombroski, K. S. Machado, C. Scapulatempo Fernandes, M. Bessa, *Int. J. Environ. Sci. Technol.*, 9 (2012) 409.
- [85] M. Chen, P. Huang, L. Chen, *Environ. Monit. Assess.*, 185 (2013) 5639.
- [86] A. K. Singh, D. Spassova, T. White, *J. Chromatogr. B*, 706 (1998) 231.
- [87] A. Barranco, R. M. Alonso-Salces, A. Bakkali, L. A. Berruelo, B. Gallo, F. Vicente, M. Sarobe, *J. Chromatogr. A*, 988 (2003) 33.
- [88] P. Oleszczuk, S. Baran, *J. Hazard. Mater.*, 113 (2004) 237.
- [89] M. H. Habibi, M. R. Hadjmohammadi, *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, 27 (2008) 1.
- [90] P. Oleszczuk, S. Baran, E. Baranowska, J. Pranagal, *Ecol. Chem. Eng. S*, 14 (2007) 109.
- [91] F. Zehner, U. Rosenfeller, A. Mentler, M. H. Gerzabek, *Water Air Soil Pollut.*, 198 (2009) 125.
- [92] G. A. Liehr, S. Heise, W. Ahlf, K. Offermann, G. Witt, *J. Soil. Sediment.*, 13 (2013) 1270.
- [93] X. Y. Lu, T. Zhang, H. H. P. Fang, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89 (2011) 1357.

-
- [94] R. Simarro, N. González, L. F. Bautista, R. Sanz, M. C. Molina, E. Schiavi, *Water Air Soil Pollut.*, 223 (2012) 3437.
- [95] J. Mao, T. Luo, Y. Teng, Z. Li, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 70 (2012) 141.
- [96] S. Lladó, S. Covino, A. M. Solanas, M. Viñas, M. Petruccioli, A. D'annibale, *J. Hazard. Mater.*, 248 (2013) 407.
- [97] L. C. A. Amorim, J. M. Dimandja, Z. L. Cardeal, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 2900.
- [98] X. Wang, L. Lin, T. Luan, L. Yang, N. F. Y. Tam, *Anal. Chim. Acta*, 753 (2012) 57.
- [99] R. H. Peng, A. S. Xiong, Y. Xue, X. Y. Fu, F. Gao, W. Zhao, Y. S. Tian, Q. H. Yao, *FEMS Microbiol. Rev.*, 32 (2008) 927.
- [100] A. K. Haritash, C. P. Kaushik, *J. Hazard. Mater.*, 169 (2009) 1.
- [101] M. A. Siddiqi, Z. X. Yuan, S. A. Honey, S. Kumar, H. C. Sikka, *Polycyclic Aromat. Compd.*, 22 (2002) 621.
- [102] S. K. Samantha, O. V. Singh, R. K. Jain, *Trends Biotechnol.*, 20 (2000) 243.
- [103] Y. Seo, P. L. Bishop, *Environ. Sci. Technol.*, 41 (2007) 7107.
- [104] J. F. Dou, X. Liu, A. Z. Ding, *J. Hazard. Mater.*, 165 (2009) 325.
- [105] Y. Teng, Y. M. Luo, L. F. Ping, D. X. Zou, Z. A. Li, P. Christie, *Biodegradation*, 21 (2010) 167.
- [106] C. E. Cerniglia, *Biodegradation*, 3 (1992) 351.
- [107] S. M. Bamforth, I. Singleton, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 80 (2005) 723.
- [108] J. C. Tsai, M. Kumar, J. G. Lin, *J. Hazard. Mater.*, 164 (2009) 847.
- [109] L. A. Betancur-Galvis, D. Alvarez-Bernal, A. C. Ramos-Valdivia, L. Dendooven, *Chemosphere*, 62 (2006) 1749.
- [110] K. Nam, J. Y. Kim, *Environ. Pollut.*, 118 (2002) 427.
- [111] G. J. Verrhiest, B. Clement, B. Volat, B. Montuelle, Y. Perrodin, *Chemosphere*, 46 (2002) 187.
- [112] X.X. Zhang, S.P. Cheng, J.C. Zhu, S.L. Sun, *Pedosphere*, 16 (2006) 555.
- [113] C. Quantin, E. J. Joner, J. M. Portal, J. Berthelin, *Environ. Pollut.*, 134 (2005) 315.
- [114] I. Ortiz, R. Auria, J. C. Sigoillot, S. Revah, *Environ. Sci. Technol.*, 37 (2003) 805.
- [115] A. R. Almas, L. R. Bakken, J. Mulder, *Soil Biol. Biochem.*, 36 (2004) 805.
- [116] W. Peijnenburg, *Dev. Soil Sci.*, 29 (2004) 245.
- [117] E. Elovaara, V. Väänänen, J. Mikkola, *Arch. Toxicol.*, 77 (2003) 183.
- [118] T. G. Luan, K. S. H. Yu, Y. Zhong, H. W. Zhou, C. Y. Lan, N. F. Y. Tam, *Chemosphere*, 65 (2006) 2289.

- [119] F. Li, X. Li, X. Liu, L. Zhang, L. You, J. Zhao, H. Wu, *Environ. Toxicol. Phar.*, 32 (2011) 373.
- [120] L. C. Romanoff, Z. Li, K. J. Young, N. C. Blakely, D. G. Patterson, C. D. Sandau, *J. Chromatogr. B*, 835 (2009) 47.
- [121] T. T. T. Lee, B. K. Lee, *Chemosphere*, 74 (2009) 1245.
- [122] L. R. Wang, Y. Wang, J. W. Chen, L. H. Guo, *Toxicology*, 262 (2009) 250.
- [123] K. Hayakawa, Y. Onoda, C. Tachikawa, S. Hosoi, M. Yoshida, S. W. Chung, R. Kizu, A. Toriba, T. Kameda, N. Tang, *J. Health Sci.*, 53 (2007) 562.
- [124] Y. Guo, K. Senthilkumar, H. Alomirah, H. B. Moon, T. B. Minh, M. A. Mohd, H. Nakata, K. Kannan, *Environ. Sci. Technol.*, 47 (2013) 2932.
- [125] S. Ferrari, F. Mandel, J. D. Berset, *Chemosphere*, 47 (2002) 173.
- [126] P. Jacob, M. Wilson, N. L. Benowitz, *Anal. Chem.*, 79 (2007) 587.
- [127] A. I. Barrado, S. Garcia, Y. Castrillejo, R. M. Perez, *Atmos. Pollut. Res.*, 3 (2012) 81.
- [128] C. J. Smith, J. Grainger, D. G. Patterson, *J. Chromatogr. A*, 803 (1998) 241.
- [129] X. Xu, R. J. Hurtubise, *J. Chromatogr. A*, 829 (1999) 289.
- [130] N. Grova, F. Monteau, B. Le Bizec, C. Feidt, F. Andre, G. Rychen, *J. Anal. Toxicol.*, 29 (2005) 175.
- [131] T. Luan, S. Fang, Y. Zhong, L. Lin, S. M. N. Chan, C. Lan, N. F. Y. Tam, *J. Chromatogr. A*, 1173 (2007) 203.
- [132] K. Li, L. A. Woodward, A. E. Karu, Q. X. Li, *Anal. Chim. Acta*, 419 (2000) 1.
- [133] B. Johnson-Restrepo, J. Oliveiro-Verbel, S. Lu, J. Guette-Fernández, R. Bladiris- Avila, I. O'Byrne-Hoyos, K. M. Aldous, R. Addink, K. Kannan, *Environ. Pollut.*, 151 (2008) 452.
- [134] S. Lundstedt, P. Haglund, L. Öberg, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 2993.
- [135] B. A. M. Bandowe, W. Wilcke, *J. Environ. Qual.*, 39 (2010) 1349.
- [136] S. Meyer, S. Cartellieri, H. Steinhart, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 4023.
- [137] L. Chen, S. Xu, J. Li, *Chem. Soc. Rev.*, 40 (2011) 2922.
- [138] F. Augusto, L. W. Hantao, N. G. S. Mogollón, S. C. G. N. Braga, *Trends Anal. Chem.*, 43 (2013) 14.
- [139] K. Golker, B. C. G. Karlsson, G. D. Olsson, A. M. Rosengren, I. A. Nicholls, *Macromolecules*, 46 (2013) 1408.
- [140] H. Yan, K. H. Row, *Int. J. Mol. Sci.*, 7 (2006) 155.
- [141] PolyIntell, *Molecularly Imprinted Polymers*, <http://www.polyintell.com/technology/molecularly-imprinted-polymers/> [En línia], Gener 2012.

- [142] G. Vasapollo, R. Del Sole, L. Mergola, M. R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, G. Mele, *Int. J. Mol. Sci.*, 12 (2011) 5908.
- [143] D. R. Kryscio, N. A. Peppas, *Acta Biomater.*, 8 (2012) 461.
- [144] V. Pichon, F. Chapuis-Hugon, *Anal. Chim. Acta*, 622 (2008) 48.
- [145] W. J. Cheong, S. H. Yang, F. Ali, *J. Sep. Sci.*, 36 (2013) 609.
- [146] W. H. Ali, D. Derrien, F. Alix, C. Pérollier, O. Lépine, S. Bayouth, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, *J. Chromatogr. A*, 1217 (2010) 6668.
- [147] L. G. Chen, B. Li, *Food Chem.*, 141 (2013) 23.
- [148] L. Drabova, M. Tomaniova, K. Kalchova, V. Kocourek, J. Hajslova, J. Pulkrabova, *Food Control*, 33 (2013) 489.
- [149] B. Claude, P. Morin, S. Bayouth, J. de Ceaurriz, *J. Chromatogr. A*, 1196 (2008) 81.
- [150] P. Manesiotis, S. Kashani, P. McLoughlin, *Anal. Methods-UK*, 5 (2013) 3122.
- [151] M. K. R. Mudiam, A. Chauhan, A. K. Singh, V. P. Sharma, P. N. Saxena, *Bioanalysis*, 5 (2013) 847.
- [152] P. Lucci, O. Núñez, M. T. Galceran, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 4828.
- [153] Q. Z. Feng, y. Chen, D. D. Xu, L. Y. Liu, Z. J. Zhang, *Open. J. Polym. Chem.*, 3 (2013) 54.
- [154] X. B. Luo, R. Z. Dong, S. L. Luo, Y. C. Zhan, X. M. Tu, L. X. Yang, *J. Appl. Polym. Sci.*, 127 (2013) 2884.
- [155] H. Abedi, H. Ebrahimzadeh, *React. Funct. Polym.*, 73 (2013) 634.
- [156] K. N. Awokoya, B. A. Moronkola, S. Chigome, D. A. Ondigo, Z. Tshentu, N. Torto, *J. Polym. Res.*, 20 (2013) 148.
- [157] Q. Z. Zhu, P. Degelmann, R. Niessner, D. Knopp, *Environ. Sci. Technol.*, 36 (2002) 5411.
- [158] X. W. Fu, Y. J. Wu, J. R. Qu, H. Yang, *Environ. Monit. Assess.*, 184 (2012) 4161.
- [159] X. Zhu, J. Yang, Q. Su, J. Cai, Y. Gao, *J. Chromatogr. A*, 1092 (2005) 161.
- [160] Z. L. Shen, D. Yuan, Q. D. Su, H. Zhang, J. Wang, J. H. Zhu, Y. M. Liu, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 75 (2011) 473.
- [161] Y. Hu, J. Li, G. Li, *J. Sep. Sci.*, 34 (2011) 1190.
- [162] E. Turiel, A. Martin-Esteban, J. L. Tadeo, *J. Chromatogr. A*, 1172 (2007) 97.
- [163] T. Wang, J. Tong, M. Sun, L. Chen, *J. Sep. Sci.*, 34 (2011) 1886.
- [164] S. Mei, D. Wu, M. Jiang, B. Lu, J. M. Lim, Y. K. Zhou, Y. I. Lee, *Microchem. J.*, 98 (2011) 150.
- [165] Y. Wen, L. Chen, J. Li, Y. Ma, S. Xu, Z. Zhang, Z. Niu, J. Choo, *Electrophoresis*, 33 (2012) 2454.

- [166] S. Xu, L. Chen, J. Li, W. Qin, J. Ma, *J. Mater. Chem.*, 21 (2011) 12047.
- [167] Y. Martínez, C. Rivero, *Rev. Ingeniería UC*, 12 (2005) 14.
- [168] R. A. Wuana, F. E. Okieimen, *ISRN Ecol.*, DOI:10.5402/2011/402647 (2011).
- [169] X. Yan, F. Zhang, C. Zeng, M. Zhang, L. P. Devkota, T. Yao, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 9 (2012) 3209.
- [170] P. J. Craig, *Organometallic compounds in the environment*, Ed. John Wiley & Sons Ltd. (2003), West Sussex, Regne Unit.
- [171] Centre on Emission Inventories and Projections (CEIP), Officially reported activity data, <http://www.ceip.at/webdab-emission-database/officially-reported-activity-data/> [En línia], Abril 2013.
- [172] W. E. H. Blum, O. Horak, A. Mentler, M. Puschenreiter, *Environmental and Ecological Chemistry*, Volum 2, Ed. EOLSS Publishers Company Limited (2009), Oxford, Regne Unit.
- [173] A. Kabata-Pendias, *Trace Elements in Soils & Plants*, Ed. CRC Press (2000), Boca Raton, Estats Units.
- [174] T. W. Speir, H. A. Kettles, H. J. Percival, A. Parshotam, *Soil Biol. Biochem.*, 31 (1999) 1953.
- [175] V. Rajaganapathy, F. Xavier, D. Sreekumar, P. K. Mandal, *J. Environ. Sci. Technol.*, 4 (2011) 234.
- [176] A. Bielicka, I. Bojanowska, A. Wisniewski, *Pol. J. Environ. Stud.*, 14 (2005) 5.
- [177] G. Rayner-Canham, *Química inorgànica descriptiva*, Ed. Pearson (2000), Naucalpan de Juárez, Mèxic.
- [178] R. Singh, N. Gautam, A. Mishra, R. Gupta, *Indian J. Pharmacol.*, 43 (2011) 246.
- [179] A. B. Santamaria, *J. Med. Res.*, 128 (2008) 484.
- [180] Digital Fire Hazards Database, Cobalt Toxicology, http://digitalfire.com/4sight/hazards/ceramic_hazard_cobalt_toxicology_331.html [En línia], Abril 2012.
- [181] IARC International Agency for Research on Cancer (IARC), Agents Classified by the IARC Monographs, <http://www.monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf> [En línia], Agost 2012.
- [182] M. Cempel, G. Nikel, *Polish J. Environ. Stud.*, 15 (2006) 375. Abril 2012.
- [183] B. R. Stern, M. Solioz, D. Krewski, P. Affett, T. C. Aw, S. Baker, K. Crump, M. Dourson, L. Haber, R. Hertzberg, C. Keen, B. Meek, L. Rudenko, R. Schoeny, W. Slob, T. Starr, *J. Toxicol. Environ. Health*, 10 (2007) 157.
- [184] Agency for Toxic Substances and Disease Registry, Toxicological Profile for Zinc, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp60-c6.pdf> [En línia], Abril 2012.

- [185] The Council of the European Union, Directive 96/61/EC, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CELEX:31996L0061:en:HTML> [En línia], Juliol 2013.
- [186] The European Parliament and The Council of the European Union, Directive 2001/80/EC, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2001:309:0001:0001:EN:PDF> [En línia], Juliol 2013.
- [187] The European Parliament and The Council of the European Union, Directive 2002/32/EC, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2002:140:0010:0021:EN:PDF> [En línia], Juliol 2013.
- [188] The Council of the European communities, Directive 86/278/EEC, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:1986:181:0006:0012:EN:PDF> [En línia], Juliol 2013.
- [189] The European Parliament and The Council of the European Union, Directive 2004/35/CE, <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:143:0056:0075:en:PDF> [En línia], Juliol 2013.
- [190] Joint Research Centre, <http://www.ec.europa.eu/dgs/jrc/index.cfm> [En línia], Març 2013.
- [191] Gobierno de España, Real Decreto 1310/1990, <http://www.boe.es/boe/dias/1990/11/01/pdfs/A32339-32340.pdf> [En línia], Març 2013.
- [192] Generalitat de Catalunya, , Nivells Genèrics de referència dels elements traça en sòls a Catalunya per a la protecció de la salut humana, http://www20.gencat.cat/docs/arc/Home/LAgencia/Publicacions/Sols%20Contaminats/sols_nivellprotsalut.pdf [En línia], Març 2013.
- [193] W. J. Deng, P. K. K. Louie, W. K. Liu, X. H. Bi, J. M. Fu, M. H. Wong, Atmos. Environ., 40 (2006) 6945.
- [194] L. Hajiaghababaei, T. Tajmiri, A. Badiei, M. R. Ganjali, Y. Khaniani, G. M. Ghodsi, Food Chem., 141 (2013) 1916.
- [195] G. Pérez, M. Valiente, J. Environ. Monit., 7 (2005) 29.
- [196] J. A. Muñoz, M. Valiente, Urol. Res., 33 (2005) 267.
- [197] M. Lopez-Mesas, E. R. Navarrete, F. Carrillo, C. Palet, Chem. Eng. J., 174 (2011) 9.
- [198] M. Coskun, E. Steinnes, M. V. Frontasyeva, T. E. Sjobakk, S. Demkina, Environ. Monit. Assess., 119 (2006) 545.
- [199] T. Radu, D. Diamond, J. Hazard. Mater., 171 (2009) 1168.
- [200] A. Bernaus, X. Gaona, D. Van Ree, M. Valiente, Anal. Chim. Acta, 565 (2006) 73.
- [201] L. Borgese, S. Federici, A. Zacco, A. Gianoncelli, L. Rizzo, D. R. Smith, F. Donna, R. Lucchini, L. E. Depero, E. Bontempi, Environ. Sci. Pollut. R., 20 (2013) 5067.
- [202] K. Zehl, J. W. Einax, J. Soil. Sediment., 5 (2005) 164.

- [203] Y. Hu, X. Liu, J. Bai, K. Shih, E. Y. Zheng, H. Cheng, *Environ. Sci. Pollut. R.*, 20 (2013) 6150.
- [204] A. Bernaus, X. Gaona, M. Valiente, *J. Environ. Monitor.*, 7 (2005) 771.
- [205] W. S. K. Bong, I. Nakai, S. Furuya, H. Suzuki, Y. Abe, K. Osaka, T. Matsumoto, M. Itou, N. Imai, T. Ninomiya, *Chem. Lett.*, 40 (2011) 1310.
- [206] M. Avila, G. Perez, M. Esshaimi, L. Mandi, M. Ouazzani, J. L. Brioso, M. Valiente, *Open Environ. Pollut. Toxicol. J.*, 3 (2012) 2.
- [207] Thermo Elemental, AAS, GFAAS, ICP or ICP/MS? Which technique should I use?, http://www.thermo.com/eThermo/CMA/PDFs/Articles/articlesFile_18407.pdf [En línia], Juliol 2013.
- [208] K. E. Giller, E. Witter, S. P. McGrath, *Soil. Biol. Biochem.*, 30 (1998) 1389.
- [209] L. Landi, G. Renella, J. L. Moreno, L. Falchini, P. Nannipieri, *Biol. Fertil. Soils*, 32 (2000) 8.
- [210] M. Megharaj, I. Singleton, N. C. McClure, R. Naidu, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 38 (2000) 439.
- [211] M. Smejkalova, O. Mikanova, L. Boruvka, *Plant Soil Environ.*, 40 (2003) 321.
- [212] M. Liao, C. L. Chen, C. Y. Huang, *J. Environ. Sci.*, 17 (2005) 832.
- [213] G. Alug, N. Balkis, *Environ. Monit. Assess.*, 149 (2009) 61.
- [214] C. J. Moreau, P. L. Klerks, C. N. Haas, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 37 (1999) 251.
- [215] G. Shen, Y. Lu, Q. Zhou, J. Hong, *Chemosphere*, 61 (2005) 1175.
- [216] G. Shen, Y. Lu, Q. Zhou, J. Hong, *Ecotox. Environ. Safe*, 63 (2006) 474.
- [217] S. Fualkowska, K. Lisowska, J. Dlugonski, *J. Basic. Microbiol.*, 38 (1998) 361.
- [218] J. Sokhn, F. A. A. M. De Leij, T. D. Hart, J. M. Lynch, *Lett. Appl. Microbiol.*, 33 (2001) 164.
- [219] P. Baldrian, C. Wiesche, J. Gabriel, F. Nerud, F. Zadrazil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (2000) 2471.
- [220] S. Khan, A. E. L. Hesham, G. Qing, L. Shuang, J. He, *J. Soil. Sediment.*, 9 (2009) 482.
- [221] L. Ke, L. Luo, P. Wang, T. Luan, N. F. Y. Tam, *Bioresour. Technol.*, 101 (2010) 6950.
- [222] P. Thavamani, S. Malik, M. Beer, M. Megharaj, R. Naidu, *J. Environ. Manage.*, 99 (2012) 10.
- [223] I. S. Obuekwe, K. T. Semple, *Environ. Monit. Assess.*, DOI 10.1007/s10661-013-3311-3 (2013)
- [224] A. R. Conklin Jr., *Field Sampling*, Ed. Marcel Dekker Inc. (2005), Nova York, Estats Units.
- [225] S. L. Lohr, *Sampling Design and Analysis*, Ed. Brooks/Cole (2011), Boston, Estats Units.
- [226] M. R. Carter, E. G. Gregorich, *Soil Sampling and Methods of Analysis*, CRC Press (2008), Boca Raton, Estats Units.

- [227] A. D. Aczel, J. Sounderpandian, Complete Business Statistics, Ed. McGraw-Hill (2009) , Nova York, Estats Units.
- [228] M. Matranga, Mobility and mobilisation of heavy metals and PAHs in partially wàter repellent urban soils, Tesi Doctoral (2012), Technische Universität Berlin, Berlin, Alemanya.
- [229] C. Kechavarzi, Q. Dawson, M. Bartlett, P. B. Leeds-Harrison, Geoderma, 154 (2010) 203.
- [230] W. Cheswoth, Encyclopedia of Soil Science, Ed. Springer (2008), New York, Estats Units.
- [231] J. D. Rhoades, F. Chanduvi, S. Lesch, Soil salinity assessment, Ed. Food and Agriculture Organization of the United Nations (1999), Riverside, Estats Units.
- [232] R. H. Loeppert, D. L. Suarez, Carbonate and Gypsum, Ed USDA-ARS Publications (1996), Nebraska, Estats Units.
- [233] Food and Agriculture Organization of the United Nations, Guidelines for Soil Description, Ed. FAO Fiat Panis (2006), Roma, Itàlia.
- [234] Y. Yang, N. Zhang, M. Xue, S. T. Lu, S. Tao, Environ. Pollut., 159 (2011) 591.
- [235] E. Rusco, R. Jones, G. Bidoglio, Organic matter in the soils of Europe, http://www.google.es/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CDYQFjAA&url=http%3A%2F%2Fusoils.jrc.ec.europa.eu%2Fesdb_archive%2Fusoils_docs%2Fother%2FESF_OM7.pdf&ei=0lk8UsyWE8mM0wXg_YGoDw&usq=AFQjCNHTY2cx031JOX4Nop7zPQ9U3dRWQw&sig2=M8lsl3dMrdo-kl9Wdc0nxQ&bvm=bv.51495398,d.d2k [En línia], Maig 2013.
- [236] M. H. Nachabe, J. Irrig. Drain. Eng., 124 (1998) 230.
- [237] Y. Martinez, C. Rivero, Rev. Ingeniería UV, 12 (2005) 14.
- [238] R. R. Rodriguez, N. T. Basta, S. W. Casteel, F. P. Armstrong, D. C. Ward, J. Environ. Qual., 32 (2003) 876.
- [239] A. K. Gupta, S. Sinha, J. Hazard. Mater., 149 (2007) 144.
- [240] D. Bakircioglu, Y. B. Kurtulus, H. Ibar, Clean-Soil, Air, Water, 39 (2011) 728.
- [241] Y. Fujikawa, M. Fukui, A. Kudo, Water Air Soil Poll., 124 (2000) 1.
- [242] Dollar, N. L., Souch, C. J., Filippelli, G. M., Mastalerz, M., Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 3608.
- [243] D. G. Hamid, N. A. Kamili, N. Ruqeya, A. S. Bandh, B. R. Ahmad, Int. J. Curr. Res., 4 (2012) 467.
- [244] L. A. Burrows, C. A. Edwards, Ecotoxicology, 13 (2004) 143.
- [245] R. J. Ellis, J. Microbiol. Meth., 56 (2004) 287.
- [246] P. Grenni, F. Falconi, A. B. Caracciolo, Chem. Eng. Trans., 28 (2012) 7.

[247] M. Niepceron, F. Martin-Laurent, M. Crampon, F. Portet-Koltalo, M. Akpa-Vinceslas, M. Legras, D. Bru, F. Bureau, J. Bodilis, *Environ. Pollut.*, 180 (2013) 199.

[248] C. Muangchinda, R. Pansri, W. Wongwongsee, O. Pinyakong, *J. Appl. Microbiol.*, 114 (2013) 1311.

[249] M. Sun, Y. Luo, Y. Teng, Z. Jia, Z. Li, S. Deng, *Environ. Sci. Pollut. Res.*, 20 (2013) 976.

CAPÍTOL SEGON
EXPERIMENTAL

| | |
|--|------------|
| 2. EXPERIMENTAL | 105 |
| 2.1. REACTIUS I DISSOLVENTS | 105 |
| 2.2. SOLUCIONS | 107 |
| 2.3. MATERIALS I EQUIPS | 107 |
| 2.4. MÈTODES ANALÍTICS D'EXTRACCIÓ | 109 |
| 2.4.1. EXTRACCIÓ SOXHLET | 109 |
| 2.4.2. EXTRACCIÓ ASSISTIDA PER MICROONES | 111 |
| 2.4.2.1. EXTRACCIÓ DELS PAHs | 112 |
| 2.4.2.2. EXTRACCIÓ DELS OH-PAHs..... | 113 |
| 2.5. MÈTODES ANALÍTICS DE PURIFICACIÓ | 113 |
| 2.5.1. EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA (SPE) | 113 |
| 2.5.1.1. SPE C18..... | 113 |
| 2.5.1.2. SPE AMB SÍLICE COMPACTADA | 115 |
| 2.5.1.3. SPE MIPs | 115 |
| 2.5.2. PURIFICACIÓ EN COLUMNA | 116 |
| 2.5.2.1. COLUMNA AMB GEL DE SÍLICE..... | 116 |
| 2.5.2.2. COLUMNA MIXTA AMB GEL DE SÍLICE I ALÚMINA..... | 117 |
| 2.6. TÈCNiques INSTRUMENTALS D'ANÀLISI | 117 |
| 2.6.1. ANALITZADOR PORTÀTIL DE FLUORESCÈNCIA DE RAJOS X (FP-XRF) | 117 |
| 2.6.2. ESPECTROMETRIA DE MASSES AMB FONT DE PLASMA ACOBLAT INDUCTIVAMENT (ICP/MS) | 119 |
| 2.6.3. CROMATOGRÀFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ AMB DETECTOR DE FLUORESCÈNCIA (HPLC/FLD)..... | 122 |
| 2.6.4. CROMATOGRÀFIA DE GASOS ACOBLADA A L'ESPECTROMETRIA DE MASSES (GC/MS)..... | 123 |
| 2.6.4.1. ANÀLISI DELS PAHs | 124 |
| 2.6.4.2. ANÀLISI DELS OH-PAHs..... | 127 |
| 2.7. MOSTRES ANALITZADES | 129 |
| 2.7.1. DESCRIPCIÓ DE LES MOSTRES | 130 |
| 2.7.2. PRETRACTAMENT I CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES | 135 |
| 2.8. CARACTERITZACIÓ DE LES MOSTRES | 136 |
| 2.8.1. HUMITAT | 137 |

| | | |
|--------------|--|------------|
| 2.8.2. | pH | 137 |
| 2.8.3. | CONDUCTIVITAT ELÈCTRICA..... | 137 |
| 2.8.4. | PERCENTATGE DE CARBONATS | 137 |
| 2.8.5. | MATÈRIA ORGÀNICA..... | 138 |
| 2.8.6. | CAPACITAT MÀXIMA DE RETENCIÓ D'AIGUA..... | 138 |
| 2.8.7. | METALLS PESANTS..... | 138 |
| 2.8.7.1. | FRACCIÓ TOTAL..... | 139 |
| 2.8.7.2. | FRACCIÓ BIODISPONIBLE..... | 139 |
| 2.8.8. | DETERMINACIÓ DE LES UNITATS FORMADORES DE COLÒNIES (CFU) | 139 |
| 2.9. | DOPATGE DE SÒLS | 141 |
| 2.9.1. | DOPATGE DEL SÒL D'YVETOT AMB OH-PAHs | 141 |
| 2.9.2. | DOPATGE DEL SOL DE SABADELL AMB METALLS PESANTS | 142 |
| 2.10. | MICROCOSMOS | 143 |
| 2.10.1. | MICROCOSMOS PREPARATS A PARTIR DEL SÒL D'YVETOT | 143 |
| 2.10.2. | MICROCOSMOS PREPARATS A PARTIR DEL SÒL DE SANT QUIRZE, POLINYÀ I SABADELL | 145 |
| 2.10.3. | MICROCOSMOS PREPARATS A PARTIR DEL SÒL DE SABADELL..... | 147 |
| 2.11. | BIBLIOGRAFIA..... | 148 |

2. EXPERIMENTAL

2.1. REACTIUS I DISSOLVENTS

- ✓ 1-hidroxipirè 98 %, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, França
- ✓ 2-hidroxifluorè 98 %, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, França
- ✓ 2-hidroxinaftalè 99 %, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, França
- ✓ 9-hidroxifenantrè 98 %, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, França
- ✓ Acetona 99,5 %, J. T. Baker, Londres, Regne Unit
- ✓ Acetona GC ultra traça, Scharlab, Barcelona, Espanya
- ✓ Acetona HPLC grade 99 % min., Fisher Scientific, Illkirsh, França
- ✓ Acetonitril Cromasolv HPLC 99,9+ %, Sigma Aldrich, Barcelona, Espanya
- ✓ Acetonitril HPLC grade 99 % min., Fisher Scientific, Illkirsh, França
- ✓ Àcid acètic 99,5 %, Fisher Scientific, Illkirsh, França
- ✓ Àcid clorhídric 37 %, Panreac, Barcelona, Espanya
- ✓ Àcid clorhídric 37 %, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, França
- ✓ Àcid fòrmic 95 %, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, França
- ✓ Àcid nítric 69,5 %, Sigma Aldrich, Barcelona, Espanya
- ✓ Àcid trifluoroacètic 99 %, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, França
- ✓ Alúmina neutra 90, 70-230 µm, Panreac, Barcelona, Espanya
- ✓ Benzè 99,8 %, Merck, Madrid, Espanya
- ✓ Benzo(a)Antracè, Sigma Aldrich, Madrid, Espanya
- ✓ Benzo(a)Pirè, Sigma Aldrich, Madrid, Espanya
- ✓ Benzo(b)Fluorantè, Sigma Aldrich, Madrid, Espanya
- ✓ BSTFA 99+ %, Sigma Aldrich, Barcelona, Espanya
- ✓ BSTFA 99+ %, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, França
- ✓ Cartutxos SPE AFFINIMIP®SPE Phenolics 0,5 g, PolyIntell, Val de Reuil, França
- ✓ Cartutxos SPE C18 Bond Elut 0,5 g, Varian, Palo Alto, Estats Units
- ✓ Cartutxos SPE de sílica ExtraBond SIL 0,5 g Scharlau, Scharlab, Barcelona, Espanya
- ✓ Crisè, Sigma Aldrich, Madrid, Espanya

- ✓ Ciclohexà 99+ %, Alfa Aesar, Barcelona, Espanya
- ✓ Cloroform, HPLC grade 99 % min., Fisher Scientific, Illkirsh, França
- ✓ Fenantrè deuterat, Sigma Aldrich, Madrid, Espanya
- ✓ Diclorometà 99,5 %, Alfa Aesar, Barcelona, Espanya
- ✓ Diclorometà, HPLC grade 99 % min., Fisher Scientific, Illkirsh, França
- ✓ Etanol, HPLC grade 99 % min., Fisher Scientific, Illkirsh, França
- ✓ Fluorantè, Sigma Aldrich, Madrid, Espanya
- ✓ Gel de sílice 60, 63-200 μm , Panreac, Barcelona, Espanya
- ✓ Heli 99,9992 %, Abelló Linde, Barcelona, Espanya
- ✓ Heli BIP 99,9997 %, Air Products, Barcelona, Espanya
- ✓ Heli Premier 99,9992 %, Air Products, Barcelona, Espanya
- ✓ Hexà Environmental Grade 99 % min., Alfa Aesar, Barcelona, Espanya
- ✓ Hidròxid de sodi 98 %, Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, França
- ✓ Isopropanol, 99,8%, Panreac, Barcelona, Espanya
- ✓ Material de referència certificat: Semi-VOAs in Soil CRM 115-100, RTC, Wyoming, Estats Units
- ✓ Mescla PAHs 2000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Z-0146, AccuStandard, New Haven, Estats Units
- ✓ Metanol 99,8 %, J.T. Baker, Londres, Regne Unit
- ✓ Metanol, HPLC grade 99 % min., Fisher Scientific, Illkirsh, França
- ✓ Nitrat de cobalt hexahidratat 99 %, Merck, Madrid, Espanya
- ✓ Nitrat de crom nonahidratat 98 %, Merck, Madrid, Espanya
- ✓ Nitrat de manganès tetrahidratat 98,5 %, Merck, Madrid, Espanya
- ✓ Nitrat de plom 99,5 %, Merck, Madrid, Espanya
- ✓ Nitrat de zinc hexahidratat 99+ %, Merck, Madrid, Espanya
- ✓ Pentà HPLC grade 99 % min., Alfa Aesar, Barcelona, Espanya
- ✓ Fenantrè, Sigma Aldrich, Madrid, Espanya
- ✓ Pirè, Sigma Aldrich, Madrid, Espanya
- ✓ Ringer Oxoid BR52, Thermo Fisher Scientific, Barcelona, Espanya
- ✓ Sòl de referència certificat: San Joaquin Soil SRM 2709a, Gaithersburg, Estats Units
- ✓ Sorra de platja rentada, Panreac, Barcelona, Espanya
- ✓ Sulfat de coure pentahidratat 99-100,5 %, Merck, Madrid, Espanya
- ✓ Sulfat de sodi anhidre 99 %, Panreac, Barcelona, Espanya
- ✓ Tetrahidrofurà, HPLC grade 99 % min., Fisher Scientific, Illkirsh, França
- ✓ Toluè Cromasolv HPLC 99,9+ %, Sigma Aldrich, Barcelona, Espanya

- ✓ Toluè HPLC grade 99 % min., Fisher Scientific, Illkirsh, França
- ✓ Tryptic Soy Agar, Scharlab, Barcelona, Espanya

2.2. SOLUCIONS

- ✓ Solució HCl 10 %
- ✓ Solució HNO₃ 2 %
- ✓ Solució KCl 0,1 M
- ✓ Solució MgCl₂ 0,1 M
- ✓ Solució Ringer 1 %
- ✓ Solucions de 0,750-1,50-3,75-7,50-37,5-75,0-188 mg·L⁻¹ de les sals de Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Pb
- ✓ Solucions patró monoelementals de 1000 mg·L⁻¹ de Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Pb

2.3. MATERIALS I EQUIPS

- ✓ Agitador magnètic/Escalfador amb sensor de temperatura, model MCG15E, Ovan, Barcelona, Espanya
- ✓ Agitador rotatori, model ABT-4, SBS, Barcelona, Espanya
- ✓ Analitzador portàtil de fluorescència de rajos X (FP-XRF), model Alpha-6500R, Innov-X Systems Inc., Woburn, Estats Units
- ✓ Autoclau, model Super 62, Metalisteria Roger, Barcelona, Espanya
- ✓ Automostrejador GC/MS, model Triplus AS, ThermoFisher Scientific, Barcelona, Espanya
- ✓ Automostrejador ICP/MS, model CETAC ASX520, ThermoFisher Scientific, Omaha, USA
- ✓ Balança analítica, model AB 204-S, Mettler Toledo, Barcelona, Espanya
- ✓ Balança analítica, model AE 200, Mettler Toledo, Barcelona, Espanya
- ✓ Balança analítica, model SBC-21, Scaltec, Heiligenstadt, Alemanya
- ✓ Bany d'ultrasons, model 1200, Branson, Danbury, Estats Units
- ✓ Bany d'ultrasons, model 2510, Branson, Danbury, Estats Units
- ✓ Bomba peristàltica, model Minipuls 3, Gilson, Middleton, Estats Units
- ✓ Campana de flux laminar, model Iskra HK6, Telstar, Barcelona, Espanya
- ✓ Campana extractora, model C 1500, Burdinola, Barcelona, Espanya
- ✓ Centrifugadora, model CE-007, Digicen, Madrid, Espanya

- ✓ Chiller, model NESLAB, ThermoFisher Scientific, Omaha, Estats Units
- ✓ Columna capil·lar GC, model J&W HP-5MS 50 m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm, Agilent Technologies, Santa Clara, Estats Units
- ✓ Columna capil·lar GC, model TR5MS 30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm, ThermoFisher Scientific, Barcelona, Espanya
- ✓ Columna de vidre, model Econocolum 25 cm x 1 cm I.D., Bio-Rad, Madrid, Espanya
- ✓ Columna HPLC, model Envirosep PP C18 150 mm x 4.6 mm I.D., x 5 µm, Phenomenex, Le Pecq, França
- ✓ Conductímetre, microCM 2200, Crison, Barcelona, Espanya
- ✓ Cromatògraf de gasos, model 6850, Agilent Technologies, Santa Clara, Estats Units
- ✓ Cromatògraf de gasos, model TRACE GC ULTRA, ThermoFisher Scientific, Barcelona, Espanya
- ✓ Cromatògraf de líquids, model System Gold 126, Beckman, Fullerton, Estats Units
- ✓ Elèctrode de pH, model 2000, Crison, Barcelona, Espanya
- ✓ Espectrofotòmetre de fluorescència, model ProStar, Varian, Palo Alto, Estats Units
- ✓ Espectròmetre de masses, model DSQ II, ThermoFisher Scientific, Barcelona, Espanya
- ✓ Espectròmetre de masses amb font de plasma acoblat inductivament (ICP/MS), model X Series 2, ThermoFisher Scientific, Omaha, Estats Units
- ✓ Estufa, model Memmert ULM 400, Schwabach, Alemanya
- ✓ Evaporador rotatori, model R-200, Büchi, Postfach, Suïssa
- ✓ Evaporador rotatori, model R-205, Büchi, Postfach, Suïssa
- ✓ Evaporador rotatori, model RE111, Büchi, Postfach, Suïssa
- ✓ Filtres PTFE 0,45 µm Phenex Teflon, Phenomenex, Le Peck, França
- ✓ Filtres PVDE 0,22 µm, Tianjin Heiaon Technology, Tianjin, Xina
- ✓ Granatari, model AccuLab, Testo Industrial Services, Barcelona, Espanya
- ✓ Granatari, model ZX, Gram, Barcelona, Espanya
- ✓ Incubadora, model 237, Selecta, Barcelona, Espanya
- ✓ Incubadora, model Gallencamp Economy, Panasonic Biomedical, Leicestershire, Regne Unit
- ✓ Microones Analític, model MARS 5, CEM Corporation, Mathews, Estats Units
- ✓ Microones Analític, model MARS X, CEM Corporation, Mathews, Estats Units
- ✓ Micropipetes, model Capp de 25-200 µL i 100-1000 µL, de CappAero, Odense, Dinamarca

- ✓ Micropipetes, model Transferpette de 2-20 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL i 0,5-5 mL, Brand, Wertheim, Alemanya
- ✓ Microxeringa de 10 µL i agulla cònica de 80 mm, SGE, Barcelona, Espanya
- ✓ Microxeringa, model S700 de 10 µL i agulla cònica de 80 mm, Hamilton, Bonaduz, Suïssa
- ✓ Molturador, model RMO, Retsch, Haan, Alemanya
- ✓ Mufla, model 366 PE, Selecta, Barcelona, Espanya
- ✓ Sedaç molecular d'acer inoxidable de 2 mm de mida de porus, CISA, Barcelona, Espanya
- ✓ Sistema purificador d'aigua, model Elga Classic, Veolia Water Solutions and Technologies, Madrid, Espanya
- ✓ Sistema purificador d'aigua, model Direct Q3, Millipore, Molsheim, França
- ✓ Vacuum Manifold, model Vac Elut SPS 24, Varian, Palo Alto, Estats Units
- ✓ Vasos d'extracció, model GreenChem, CEM Corporation, Mathews, Estats Units
- ✓ Vasos de digestió, model HP-500 Plus, CEM Corporation, Mathews, Estats Units

2.4. MÈTODES ANALÍTICS D'EXTRACCIÓ

L'ús de mètodes analítics d'extracció requereix la seva validació, és a dir, la verificació de la seva efectivitat, aplicabilitat, reproductibilitat i exactitud. Per a dur a terme aquesta verificació s'utilitza un Material de Referència Certificat (CRMs), el qual assegura la traçabilitat dels resultats obtinguts des del moment de l'extracció fins a la seva anàlisi. Se selecciona un CRM amb característiques similars al tipus de mostra sota estudi, en termes de tipus de matriu, analits d'interès en el rang de mesura o concentracions esperats, els procediments utilitzats en la certificació del mateix, etc. En aquesta tesi, s'utilitza el CRM 115-100 Semi-VOAs in Soil, la composició del qual es mostra en detall a la secció 2.7.

2.4.1. EXTRACCIÓ SOXHLET

L'extracció Soxhlet s'ha aplicat per extreure els PAHs del CRM mencionat anteriorment, seguint les recomanacions descrites al mètode de la US EPA, *Method 3540C: Soxhlet extraction* [1]. El muntatge experimental per a dur aquest tipus d'extracció es mostra a la Figura 1.

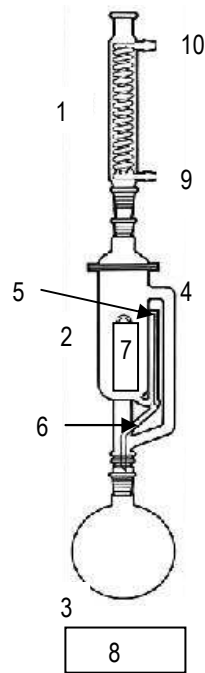


Figura 1. Muntatge experimental d'una extracció Soxhlet

1) Condensador; 2) Cos del Soxhlet; 3) Matràs de fons rodó amb el dissolvent/s extractant/s i nuclis d'ebullició; 4) Braç per l'ascens de vapor; 5) Entrada del sífó; 6) Descàrrega del sífó; 7) Càpsula porosa de cel·lulosa amb la mostra; 8) Placa calefactorsa; 9) Entrada d'aigua, 10) Sortida d'aigua

En una càpsula de cel·lulosa (7) prèviament tarada es pesen, per triplicat, 2,0000 ($\pm 0,0001$) g de mostra amb precisió analítica, assecada prèviament a 35 °C durant 24 h, i s'introdueix al cos del Soxhlet (2). La mescla de solvents emprada per l'extracció s'afegeix al matràs de fons rodó (3) i està constituïda per 200 (± 1) mL d'hexà:diclorometà (1:1), la qual s'escalfa mitjançant una placa calefactorsa (8). A mesura que bull, els vapors ascendeixen pel braç lateral (4), arribant al condensador (1) que retorna al solvent en forma de degoteig cap al cos del Soxhlet. D'aquesta manera, la càpsula de cel·lulosa que conté la mostra es va impregnant amb el solvent calent i part dels compostos d'interès s'hi van dissolent. A mesura que el solvent va omplint el recipient, també es va omplint el sífó lateral (5) fins que vessa. És en aquest moment en què es dona la descàrrega o buidat del solvent (6), al qual es troben dissolts part dels compostos extrets, fins arribar al matràs de fons rodó de partida. L'extracció es duu a terme al llarg de 18 hores des de la primera descàrrega del sífó, a un ritme de 4 cicles de càrrega-descàrrega per hora. Tanmateix, no només els compostos d'interès són extrets, sinó que d'altres lleugerament solubles també passen a la fase líquida, en forma d'impureses o interferents.

Un cop realitzada l'extracció, es filtra l'extracte obtingut de la mostra mitjançant filtres de PVDF ($<0,22 \mu\text{m}$) i es concentra amb l'evaporador rotatori fins al volum desitjat, previ a les etapes de purificació i d'anàlisi per GC/MS. L'extracció Soxhlet es realitza per triplicat i cadascun d'aquests és injectat al GC/MS per duplicat.

2.4.2. EXTRACCIÓ ASSISTIDA PER MICROONES

L'extracció per microones s'ha aplicat tant per l'extracció dels PAHs com dels OH-PAHs de mostres de sòls.

Per dur a terme les extraccions s'utilitza un Microones Analític CEM MARS 5 (Figura 2), amb capacitat d'agitació per agitar cada cel·la d'extracció, un sensor de temperatura de 0-250 °C, un sensor de pressió de 0-1,7·10⁶ Pa (0-250 psi) i un sensor de vapors orgànics. Utilitza un magnetró de 24,55 MHz per la generació de les microones i pot subministrar tres nivells de potència, 300, 800 i 1200 W. El rotor intern té una capacitat per a 12 cel·les d'extracció i oscil·la 355° a cada cicle giratori. Aquestes cel·les és on es porta a terme l'extracció de les mostres, estan fabricades de PFA (compostos de tipus perfluoroalcoxi), i són transparents a les microones. Són extremadament resistents, inerts químicament i disposen d'un sistema d'alliberació de possibles excessos de pressió a l'interior mitjançant el trencament d'una membrana de seguretat (3). Una de les cel·les, anomenada cel·la de referència, es pot connectar a un sensor de temperatura i/o pressió que permet controlar els paràmetres seleccionats durant l'extracció. A la imatge es mostren les parts principals de la cel·la d'extracció de referència del microones analític.



Figura 2. Vista general del Microones Analític MARS 5

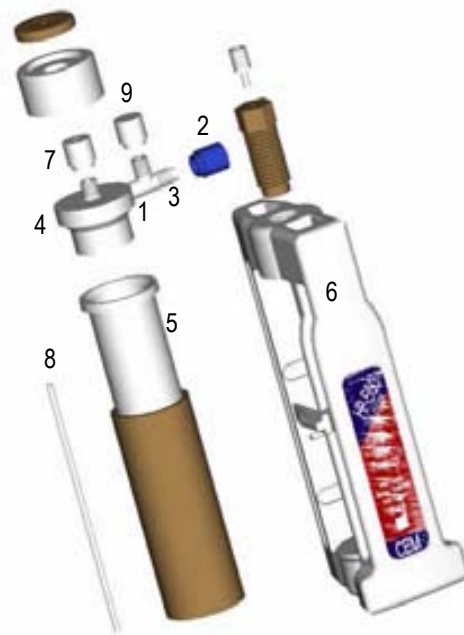


Figura 3. Parts principals d'una cel·la d'extracció de referència del microones analític

1) Tub d'escapament de gasos; 2) Rosca d'ajustament; 3) Membrana de seguretat; 4) Tapa de tefló, 5) Vas de tefló, 6) Carcassa externa, 7) Entrada de la fibra òptica, 8) Fibra òptica; 9) Control de la pressió

2.4.2.1. EXTRACCIÓ DELS PAHs

Per tal de validar el mètode d'extracció per microones, es porta a terme una extracció dels PAHs del CRM 115-100, seguint les recomanacions descrites al mètode de la US EPA, *Method 3546: Microwave extraction* [2], amb certes variacions per tal d'optimitzar l'eficiència d'extracció.

En una cel·la d'extracció prèviament tarada es pesa, per triplicat, 1,0000 ($\pm 0,0001$) g de mostra amb precisió analítica, assecada prèviament a 35 °C durant 24 h. A continuació, s'introdueix el patró intern (Phe-D₁₀) fins arribar a una concentració de 1,000 mg·L⁻¹, i es deixa evaporar el dissolvent. Tot seguit, s'introdueixen 20,00 ($\pm 0,02$) mL de la mescla extractant, formada per acetona:hexà (1:1). La programació del microones escollida assoleix una temperatura de 140 °C en 5 min, i es manté a aquesta temperatura durant 30 min més. La potència d'irradiació subministrada és de 1200 W. A continuació, l'extracte líquid es filtra amb filtres de PVDF (<0,22 μm) i es concentra amb l'evaporador rotatori fins al volum desitjat, previ a les etapes de purificació i d'anàlisi per GC/MS. (Al mètode de la US EPA, la temperatura del microones arriba fins 115 °C en 12 min i es manté durant 5 min més). L'extracció per microones es realitza per triplicat i cadascun d'aquests és injectat al GC/MS per duplicat.

2.4.2.2. EXTRACCIÓ DELS OH-PAHs

El mètode d'extracció per microones dels OH-PAHs de mostres de sòl es desenvolupa amb la col·laboració amb el centre de recerca de la *Université de Rouen-IUT d'Évreux*, als laboratoris de la unitat UMR 6014 COBRA, a Évreux (França). En tractar-se del desenvolupament d'un nou mètode d'anàlisi pels derivats monohidroxilats dels PAHs, s'optimitzen els diferents paràmetres implicats, treballant a diferents nivells de temperatura i emprant diferents tipus i volums de dissolvents extractants. Per dur a terme l'optimització dels diferents paràmetres comentats anteriorment, es procedeix a dopar una part del sòl recollit a Yvetot tal i com es troba descrit a la secció 2.9.1.

A continuació, en una cel·la d'extracció prèviament tarada, es pesa, per triplicat, 1,0000 ($\pm 0,0001$) g de mostra amb precisió analítica, assecada prèviament a 35 °C durant 24 h. Tot seguit, s'introdueixen 25,00 ($\pm 0,03$) mL de diferents dissolvents orgànics purs (diclorometà, acetonitril) i d'algunes mescles de solvents (acetonitril mesclat amb toluè, àcid clorhídric, hidròxid de sodi, tetrahidrofurà, cloroform i acetona). La programació del microones, en aquest cas, augmenta al llarg de 5 min fins a 100, 120 i 140 °C (temperatures assajades), a les quals es manté durant 30 min a 1200 W de potència d'irradiació. A continuació, l'extracte líquid es filtra amb filtres de PVDF ($< 0,45 \mu\text{m}$) i es concentra a l'evaporador rotatori fins al volum desitjat, previ a l'etapa de derivatització seguida de l'anàlisi per GC/MS o bé, previ a la purificació mitjançant SPE MIPs seguit de l'anàlisi per HPLC/FLD.

2.5. MÈTODES ANALÍTICS DE PURIFICACIÓ

2.5.1. EXTRACCIÓ EN FASE SÒLIDA (SPE)

2.5.1.1. SPE C18

Aquest mètode s'ha aplicat per la purificació dels PAHs després de l'extracció Soxhlet, mitjançant els cartutxos SPE Bond Elut C18 de 500 mg de Varian i l'aparell Vacuum Manifold Vac Elut SPS 24 pel control de l'aplicació de buit.

Es duen a terme les adaptacions de dos mètodes de purificació descrits a la bibliografia, anomenats V1 i V2. El primer (V1) és l'adaptació d'un mètode aplicat per l'anàlisi dels PAHs en

fangs [3] durant el desenvolupament del qual se sotmet el cartutx de SPE a una acció de buit constant de 17×10^3 Pa (5 in Hg). El primer pas consisteix en el condicionament dels cartutxos de SPE C18 amb $1,0 \times 3,0 (\pm 0,1)$ mL de metanol, seguit de $2,0 \times 3,0 (\pm 0,1)$ mL d'una solució mixta de 2-propanol:aigua (1:9). A continuació es carrega l'extracte de la mostra al cartutx i es deixa assecar durant 5 min en condicions de buit suau de 6.773 Pa (2 inHg). D'aquesta manera es pretén aconseguir que els compostos quedin retinguts a la fase adsorbent. Es renta amb $1,0 \times 3,0 (\pm 0,1)$ mL d'aigua:metanol (1:1) i es deixa assecar durant 5 min més en condicions de buit suau [3]. L'elució es fa amb $2,0 \times 1,5 (\pm 0,1)$ mL d'hexà:diclorometà (1:1) (variació no descrita al mètode, el qual estava pensat per l'anàlisi per HPLC i, per tant, l'elució es duia a terme amb acetonitril). Se selecciona aquesta mescla de solvents donada la naturalesa semi-polar dels PAHs. Finalment es porta a terme una darrera etapa d'elució amb $2,0 \times 1,5 (\pm 0,1)$ mL d'hexà.

A la Figura 4 apareix esquematitzat el mètode de purificació V1 mitjançant els cartutxos SPE C18. Es pot observar que es recullen diverses fraccions després de les diferents etapes de càrrega de mostra, neteja i elucions, amb l'objectiu de determinar la concentració de PAHs en totes elles, i avaluar si existeixen pèrdues en les etapes 2 i 3, o bé es recuperen els PAHs a les etapes 4 i 5, com és d'esperar. La darrera etapa d'elució amb hexà no es troba descrita al mètode de referència, i s'afegeix per tal d'assegurar la recuperació dels PAHs de major pes molecular (més apolars) en cas que la mescla de solvents hexà:diclorometà (1:1) no tingui prou força eluotròpica. Les fraccions recollides es concentren a l'evaporador rotatori al volum desitjat, previ a l'anàlisi per GC/MS. La purificació es realitza per triplicat i cadascun d'aquests és injectat al GC/MS per duplicat.

El segon mètode (V2) és l'adaptació d'un mètode destinat a l'anàlisi de PAHs en fulles de pi [4]. Primer de tot, es condiciona el cartutx amb $5,0 (\pm 0,1)$ mL d'hexà:diclorometà (1:1), es deixa assecar 5 min en condicions de buit suau i, a continuació, s'afegeix l'extracte de la mostra que cal purificar. L'elució es fa amb $2,0 \times 2,5 (\pm 0,1)$ mL d'hexà:diclorometà (1:1), seguit de $2,0 \times 2,5$ mL ($\pm 0,1$) d'hexà. Les dues darreres fraccions es recullen al mateix via i es concentren a l'evaporador rotatori fins al volum desitjat, previ a l'anàlisi per GC/MS. La purificació es realitza per triplicat i, cadascun d'aquests és injectat al GC/MS per duplicat.

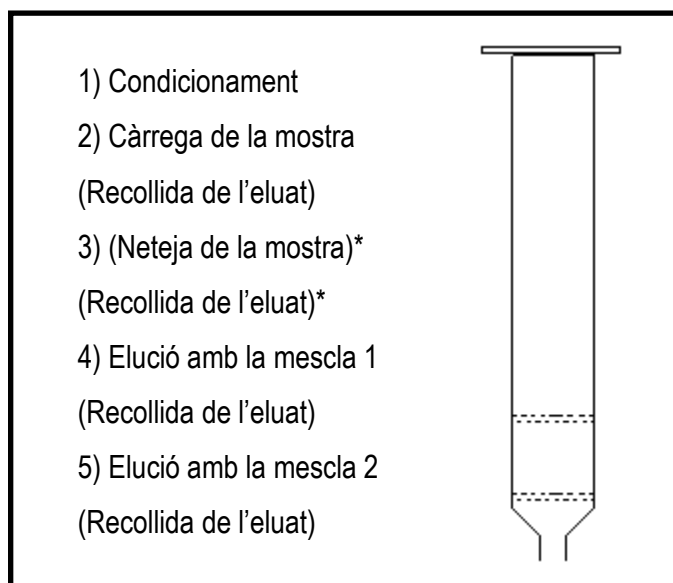


Figura 4. Etapes de purificació SPE C18

*Etapes opcionals i diferencials entre els mètodes V1 i V2

2.5.1.2. SPE AMB SÍLICE COMPACTADA

Aquest mètode s'ha aplicat per la purificació dels extractes que contenen PAHs després de l'extracció per microones, mitjançant els cartutxos de SPE amb sílice compactada ExtraBond SIL de 0,5 g de Scharlau. El condicionament dels cartutxos es fa amb 2,0 x 1,0 ($\pm 0,1$) mL d'hexà i, a continuació, es carrega la mostra al cartutx, la qual passa a través d'aquest per l'efecte de la gravetat. El pas de rentat es realitza amb 2,0 ($\pm 0,1$) mL d'hexà seguit, s'elueixen els PAHs amb 2,0 x 1,5 ($\pm 0,1$) mL d'hexà:diclorometà (1:1). Finalment es concentra amb l'evaporador rotatori fins al volum desitjat, previ a l'anàlisi per GC/MS. La purificació es realitza per triplicat i cadascun d'aquests és injectat al GC/MS per duplicat.

2.5.1.3. SPE MIPs

La purificació de l'extracte del MAE es realitza mitjançant els cartutxos AFFINIMIP®SPE Phenolics de PolyIntell, els quals són polímers comercials impremtats molecularment per a compostos fenòlics, i que estan empaquetats en cartutxos de 3 mL. Segons les recomanacions del fabricant, primer es condicionen els cartutxos amb 4,0 ($\pm 0,1$) mL de toluè i amb 2,0 x 4,0 ($\pm 0,1$) mL d'acetonitril. A continuació, l'extracte del MAE filtrat es carrega al cartutx de SPE i es porta a terme una etapa de rentat amb 4,0 ($\pm 0,1$) mL d'acetonitril. Tot seguit, s'asseca el cartutx lleugerament i els OH-PAHs s'elueixen amb diferents volums (2,00-6,00 ($\pm 0,02$) mL) i diferents

mescles de metanol amb àcids com l'àcid acètic, trifluoroacètic o àcid fòrmic, per tal de seleccionar les condicions òptimes, ja que aquesta informació no és proporcionada pel fabricant del producte. Després de l'elució, es pot concentrar amb l'evaporador rotatori fins al volum previ a les l'anàlisi per HPLC/FLD. Els mateixos polímers però, en aquest cas, sense la empremta molecular (NIPs), s'utilitzen per comprovar que el reconeixement molecular és el mecanisme de retenció principal que actua durant la purificació dels OH-PAHs. Els NIPs no són productes comercials i es van preparar especialment pel fabricant per aquest projecte de recerca.

Per dur a terme l'optimització dels diferents paràmetres comentats anteriorment, es fa servir el mateix sòl dopat amb OH-PAHs que s'utilitza per a l'optimització de les condicions d'extracció per microones, descrit anteriorment a la secció 2.4.2.2. Per tant, primer es procedeix a l'extracció dels OH-PAHs d'1,0000 ($\pm 0,0001$) g del sòl utilitzant unes condicions fixes de 25,00 ($\pm 0,03$) mL d'acetonitril i 120 °C, durant 30 min. L'extracte líquid que conté els OH-PAHs extrets del sòl s'utilitza per avaluar quina és la mescla i el volum de solvents més adequats per a l'elució dels OH-PAHs. Quan s'avaluen les diferents mescles d'elució es fixa un volum d'elució de 5,00 ($\pm 0,02$) mL, mentre que per l'avaluació del volum òptim d'elució es fixa la mescla metanol:àcid acètic (98:2) com a mescla d'elució. Finalment, els extractes purificats s'analitzen per HPLC/FLD. El procediment complet es realitza per triplicat.

2.5.2. PURIFICACIÓ EN COLUMNA

2.5.2.1. COLUMNA AMB GEL DE SÍLICE

El mètode seguit per a la purificació dels PAHs és el descrit segons la US EPA *Method 3630C: Silica Gel Cleanup* [5], aplicat després de l'extracció Soxhlet. Consisteix en preparar una columna de vidre Econocolum 25 cm x 1 cm I.D. amb gel de sílice 60, de 74-250 μm , activada prèviament durant 16 h a 130 °C a l'estufa. Es prepara una suspensió de 10,0 ($\pm 0,1$)g de gel de sílice en diclorometà i s'introdueix a la columna. S'afegeixen 1-2 cm de sorra de platja rentada i sulfat de sodi anhidre per a absorbir la humitat. A continuació es condiciona la columna fent passar 40 (± 1) mL de pentà, a uns 2,0 ($\pm 0,1$) mL \cdot min⁻¹, controlant el flux amb una bomba peristàltica. Després, sense deixar que la capa de sorra entri en contacte amb l'aire, es transfereixen 2,00 ($\pm 0,03$) mL de l'extracte del microones concentrat, amb l'ajuda de 2,0 ($\pm 0,1$) mL d'hexà per completar la transferència. Abans que la capa de sorra entri en contacte amb l'aire, s'afegeixen 25 (± 1) mL de pentà i es continua l'elució de la columna. Tot i que aquesta és una

etapa de rentat que es pot descartar, es conserva per assegurar que no hi ha pèrdues dels analits d'interès durant la mateixa. A continuació s'elueix la columna amb 25 (± 1) mL de pentà:diclorometà (3:2), fracció a la qual elueixen els analits d'interès (PAHs). Finalment, es concentra la fracció recollida a l'evaporador rotatori fins al volum desitjat, previ a l'anàlisi per GC/MS. La purificació es realitza per triplicat i, cadascun d'aquests és injectat al GC/MS per duplicat.

2.5.2.2. COLUMNA MIXTA AMB GEL DE SÍLICE I ALÚMINA

El mètode seguit és una variació d'un mètode existent pel fraccionament de mostres d'olis que contenen una mescla d'hidrocarburs alifàtics i PAHs [6], i s'ha aplicat després de l'extracció per microones. Consisteix en preparar una columna de vidre Econocolum 25 cm x 1 cm I.D. amb gel de sílice 60, de 74-250 μm i alúmina 90 neutra, de 63-210 μm , activades prèviament durant 16 h a 110 °C a l'estufa i tot seguit desactivades al 5,0 % (m/m). La columna s'omple amb 10 ($\pm 0,1$) mL d'hexà i es va afegint, en sec i per ordre, 1,0000 ($\pm 0,0001$) g de gel de sílice, 1,0000 ($\pm 0,0001$) g d'alúmina i 1,0000 ($\pm 0,0001$) g de sulfat de sodi anhidre per a absorbir la humitat. A continuació, mantenint un flux de 1-2 gotes $\cdot\text{s}^{-1}$ i sense deixar que la capa de sulfat de sodi anhidre entri en contacte amb l'aire, es transfereixen 2,000 ($\pm 0,025$) mL de l'extracte del microones concentrat, amb l'ajuda de 2,0 ($\pm 0,1$) mL d'hexà per completar la transferència. A continuació, s'afegeixen 1,5 ($\pm 0,1$) mL d'hexà, com a etapa de rentat i es continua l'elució de la columna amb 10,0 ($\pm 0,1$) mL d'hexà:diclorometà (2:1), fracció a la qual elueixen els PAHs. Finalment, es concentra la fracció recollida a l'evaporador rotatori fins al volum desitjat, previ a l'anàlisi per GC/MS. La purificació es realitza per triplicat i, cadascun d'aquests és injectat al GC/MS per duplicat.

2.6. TÈCNiques INSTRUMENTALS D'ANÀLISI

2.6.1. ANALITZADOR PORTÀTIL DE FLUORESCÈNCIA DE RAJOS X (FP-XRF)

La tècnica instrumental FP-XRF s'aplica per l'anàlisi del contingut total de metalls de les mostres de sòls recollides.

L'instrument utilitzat és un Alpha-6500R d'Innov-X Systems Inc. (Figura 5), format per un PDA i un dispositiu de dispersió d'energia en forma de tub, amb un càtode de tungstè i un ànode de

plata, que pot generar rajos X en un rang de 10-40 KeV i 10-50 μ A. L'instrument disposa d'una finestra circular d'1,4 cm de diàmetre (àrea d'1,54 cm^2) a través de la qual passen els rajos X. Utilitza un detector format per un conjunt de díodes de Si-PIN amb una capacitat de resolució de 230 eV d'amplada de banda a mitja alçada de la línia de rajos X del manganès. L'alta energia de resolució del detector permet l'ús eficient d'un mètode basat en paràmetres fonamentals (FP) per calcular les concentracions dels elements. El FP és un tractament matemàtic dels efectes provocats per la matriu química, utilitzat en conjunció amb respostes conegudes d'un element pur o d'un element patró, per desenvolupar un algoritme iteratiu que permet l'anàlisi d'elements en un tipus específic de mostra complexa (sòl, oli, pintura, etc.). El mètode FP no requereix calibratges concrets per cada tipus de mostra, encara que provinguin de diferents terrenys. El calibratge, doncs, no és necessari, només cal fer la selecció d'una de les aplicacions basades en FP (que es troben al menú del programari del PDA). El fabricant de l'instrument subministra amb l'equip diferents aplicacions per Pb en pintura (línies K i L), per pel·lícules primes, i també per sòls.

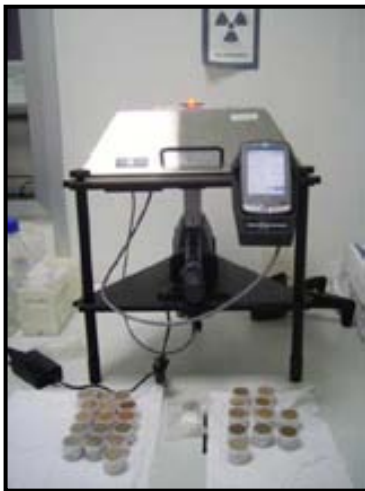


Figura 5. Analitzador portàtil de fluorescència de rajos X (FP-XRF) Alpha-6500R, d'Innov-X Systems Inc.

Abans de procedir a l'anàlisi del contingut total de metalls pesants de les mostres, aquestes es tamisen per tal d'eliminar tot tipus de residus, pedres, matèria orgànica o d'altres materials amb mida de partícula superior a 2 mm. A continuació es molturen amb un morter de tungstè per obtenir una mida de partícula inferior a 100 μ m. La mostra tractada es col·loca a una cubeta de polietilè de 25 mm de diàmetre i 20 mm d'alçada, i s'omple fins les tres quartes parts. Per últim, la cubeta es cobreix amb un film de Mylar de 3,6 μ m de gruix, transparent als rajos X.

L'instrument es programa per analitzar cadascuna de les mostres durant 120 s, en mode d'operació estàndard, utilitzant un programa de sòl en mode seqüencial i un mòdul LEAP, per la mesura de metalls pesants i elements lleugers com ara Ti, Ba i Cr. Segons la informació del fabricant, aquest període de temps és considerat el millor compromís entre exactitud, precisió i rapidesa d'anàlisi.

El control de qualitat de l'anàlisi inclou una verificació del calibratge de l'energia mitjançant l'anàlisi d'una peça metàl·lica de referència (Standardization Coupon 316 Stainless Steel), la mesura d'un blanc mitjançant una cubeta que conté SiO₂, i la mesura d'un sòl de referència certificat NIST SRM 2709a San Joaquin Soil. Les determinacions analítiques s'efectuen per duplicat i la determinació dels límits de detecció (DL) i quantificació (QL) es realitza basant-se en la relació senyal/soroll. Es comparen els senyals mesurats de patrons a baixes concentracions dels analits amb el senyal de línia base i establint la mínima concentració a la qual l'analit pot ser detectat amb fiabilitat. Una relació senyal/soroll de 3 es considera acceptable per l'estimació del DL, i de 10 vegades per l'estimació del QL [7].

2.6.2. ESPECTROMETRIA DE MASSES AMB FONT DE PLASMA ACOBLAT INDUCTIVAMENT (ICP/MS)

La tècnica instrumental ICP/MS s'aplica per l'anàlisi del contingut biodisponible de metalls pesants a les mostres de sòls recollides. El contingut biodisponible de metalls pesants es determina a partir de l'anàlisi de les fraccions hidrosoluble i intercanviable del sòl dutes a terme mitjançant l'ús d'extraccions simples (les condicions d'extracció d'aquestes fraccions es troben explicades a la secció 2.8.7.2)

L'instrument utilitzat és un ICP/MS Thermo Elemental XSeries 2 (Figura 6), juntament amb un automostrejador CETAC ASX520 amb capacitat per a 60 mostres, format per un *sipper* com a sistema d'aspiració de les mateixes i connectat a una bomba peristàltica que pot operar entre 0 i 100 rpm (corresponent a 0-2,5 mL·min⁻¹ pels tubs utilitzats de diàmetre 0,10 mm). També es disposa d'un *chiller* NESLAB Thermo Fisher per la refrigeració de les bombes de buit, d'una espira de radiofreqüència, una interfase i un sistema Peltier, que ajuda a mantenir la temperatura constant (3 °C) i permet minimitzar la formació d'espècies poliatòmiques a la cambra de nebulització (per recombinació múltiple entre elements). La generació del plasma s'efectua mitjançant un flux de gas argó a través d'una espira de radiofreqüència que opera a 1250 W de

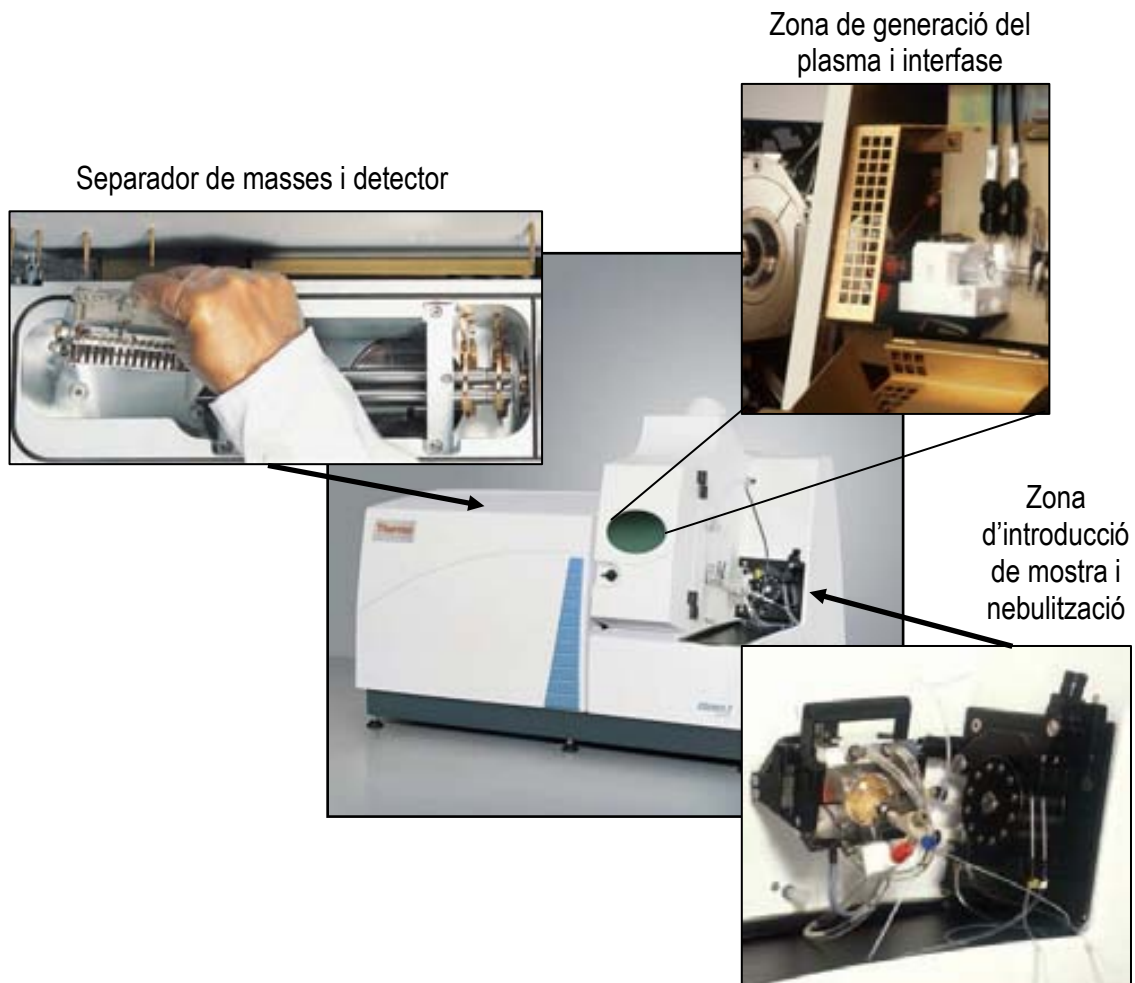


Figura 6. Vista general de l'ICP/MS Thermo Elemental XSeries 2

potència i una torxa de quars. La nebulització de la mostra es porta a terme amb un nebulitzador de tipus Meinhard. La interfase de l'instrument es troba a un buit de 220-250 Pa (2,2-2,5 mbar), creat per una bomba mecànica, i està delimitada pels cons mostrejadors i *skimmer* d'1,0 mm i 0,7 mm de diàmetre, respectivament. El sistema de lents es troba a un alt buit de 10^{-5} Pa (10^{-7} mbar), creat per una bomba turbomolecular, i guia els ions a través d'un hexapol (anomenat cel·la de col·lisió), actiu en mode CCT-KED[†] per l'eliminació d'interferències de baixa relació m/z (amb l'ajut d'un flux de gas inert d'He amb un 8 % de H₂, a un flux de 4,5 mL·min⁻¹). A continuació, un col·limador del feix d'ions permet l'arribada d'aquests fins al quadrupol, lloc on se seleccionen les masses d'interès mitjançant l'aplicació d'un camp magnètic concret. Finalment, la mostra arriba al detector format per un conjunt de dínodes que operen en mode *Pulse Counting* enregistrant

[†] L'hexapol per l'eliminació d'interferències pot operar en dos modes diferents: CCT-KED (Collision Cell Technology-Kinetic Energy Discrimination), mitjançant la qual s'eliminen un gran nombre d'interferències poliatómiques gràcies a la discriminació de les energies d'aquestes en col·lidir amb un flux de gas inert com, per exemple, l'heli. L'altre mode d'operació és el mode Normal, durant el qual la tecnologia esmentada no es troba activada i, per tant, no es dona cap tipus de discriminació d'espècies interferents.

els polsos elèctrics individuals creats per cada electró que hi arriba, i canvia de mode d'operació a mode *Analogue* quan el nombre de comptes supera els 1,5-2 milions. Es duen a terme El software pel tractament de dades és el PlasmaLab v.2.6.2., proporcionat per Thermo Scientific.

Abans de cada jornada d'anàlisi es controla que els dos modes d'operació (*Pulse Counting* i *Analogue*) funcionen seguint una relació lineal entre ells, tot realitzant calibracions creuades quan s'observa una desviació d'aquesta entre els dos modes. Es controlen diferents paràmetres, a través de solucions patró multielementals amb elements entre 7-238 uma, com per exemple, l'estabilitat (amb $^{115}\text{In} < 4\%$ RSD) i la sensibilitat (amb $^{238}\text{U} > 80$ kcps/ppb i $^{114}\text{In} > 40$ kcps/ppb) del senyal, la formació d'òxids ($^{156}\text{CeO}^+ / ^{140}\text{Ce}^+ < 2\%$) i d'espècies amb càrrega doble ($^{69}\text{Ba}^{++} / ^{138}\text{Ba} < 5\%$), així com el soroll de fons ($< 0,5\%$ a relacions m/z de 5 i 220).

Per l'anàlisi dels metalls de les mostres de sòls, el calibratge de l'instrument es duu a terme per mitjà de patrons multielementals i/o monoelementals preparats en HNO_3 2 %, percentatge màxim d'àcid per tal d'evitar el desgast de les superfícies de l'equip, principalment de la interfase. El contingut de sòlids dissolts es fixa per sota de 0,5 % per minimitzar les possibles deposicions sobre la superfície dels cons (mostrejador i *skimmer*). Com a patró intern s'utilitzen solucions de Sc, Ga, In i Tl, introduïdes durant la preparació de la mostra previ a l'anàlisi, fins a una concentració final de $5,000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Les determinacions analítiques s'efectuen per duplicat per la construcció de la recta de calibratge i per l'anàlisi de les mostres, i el control de qualitat es porta a terme avaluant blancs i patrons de control per comprovar la robustesa, reproductibilitat i exactitud del mètode o possibles efectes memòria per cadascun dels metalls a analitzar. La determinació dels límits de detecció (DL) i quantificació (QL) es realitza basant-se en la relació senyal/soroll. Es comparen els senyals mesurats de patrons a baixes concentracions dels analits amb el senyal de línia base i establint la mínima concentració a la qual l'analit pot ser detectat amb fiabilitat [7]. Una relació senyal/soroll de 3 es considera acceptable per l'estimació del DL, i de 10 vegades per l'estimació del QL. El rentat entre mostra i mostra es porta a terme amb HNO_3 (2 %) durant 1 min, a un flux de $2,5 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.

Els metalls analitzats són Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn i Pb. En tots els casos, les mostres es dilueixen en HNO_3 (2 %) i pels casos del Cr, Mn, Co, Ni, Cu i Zn s'utilitza un flux de gas auxiliar He/H₂ amb l'objectiu de reduir possibles interferències, algunes de les quals es poden observar a la Taula 1.

Taula 1. Possibles interferències en l'anàlisi i masses utilitzades

| Element interferit | Possibles Interferències | Isòtop mesurat | Observacions ^a |
|---|---|---|---|
| ⁴⁵ Sc | ¹² C ¹⁶ O ¹⁶ OH, ¹⁴ N ³¹ P | ⁴⁵ Sc | Patró Intern, CCT-KED |
| ⁵² Cr | ³⁵ Cl ¹⁶ O ¹ H, ³⁶ Ar ¹⁶ O, ⁴⁰ Ar ¹² C | ⁵⁰ Cr, ⁵² Cr, ⁵³ Cr | ⁵² Cr, amb matèria orgànica, CCT-KED |
| ⁵⁵ Mn | ³⁸ Cl ¹⁶ O ¹ H, ³⁸ Ar ¹⁶ O ¹ H | ⁵⁵ Mn | CCT-KED |
| ⁵⁹ Co | ¹⁴ N ⁴⁵ Sc | ⁵⁹ Co | CCT-KED |
| ⁶⁰ Ni | ⁵⁹ Co ¹ H | ⁶⁰ Ni | ⁶⁰ Ni, CCT-KED |
| ⁶³ Cu | ⁴⁰ Ar ²³ Na | ⁶³ Cu, ⁶⁵ Cu | ⁶³ Cu, en medi salí, CCT-KED |
| ⁶⁴ Zn / ⁶⁶ Zn | ⁶⁴ Ni / ¹⁴ N ⁵² Cr | ⁶⁶ Zn | CCT-KED |
| ⁶⁹ Ga / ⁷¹ Ga | ¹⁴ N ⁵⁵ Mn, ⁶⁸ Zn ¹ H / ¹⁶ O ⁵⁵ Mn | ⁶⁹ Ga | Patró Intern, CCT-KED |
| ¹¹⁵ In | ¹¹⁵ Sn | ¹¹⁵ In | Patró Intern |
| ²⁰⁵ Tl | ¹⁴ N ¹⁹¹ Ir | ²⁰⁵ Tl | Patró Intern |
| ²⁰⁶ Pb / ²⁰⁷ Pb / ²⁰⁸ Pb | ²⁰⁵ Tl ¹ H / ¹⁴ N ¹⁹³ Ir / ¹⁶ O ¹⁹² Os | ²⁰⁶ Pb, ²⁰⁷ Pb, ²⁰⁸ Pb | |

^a CCT-KED es refereix a la cel·la de col·lisió de l'instrument, emprada per a l'eliminació d'interferències amb un flux d'He/H₂ de 4,5 mL·min⁻¹.

2.6.3. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ AMB DETECTOR DE FLUORESCÈNCIA (HPLC/FLD)

La tècnica instrumental HPLC/FLD s'aplica per l'anàlisi dels OH-PAHs en mostres de sòls. S'empra un cromatògraf de líquids Beckman, Model System Gold 126, amb un *sample loop* de 20 µL i un espectrofotòmetre de fluorescència Varian ProStar (Figura 7a). El calibratge de l'instrument es porta a terme per mitjà de patrons sòlids dissolts en acetonitril. Les determinacions analítiques s'efectuen per triplicat per la construcció de la recta de calibratge o per duplicat per l'anàlisi dels OH-PAHs en els microcosmos preparats (secció 2.10.1 i 2.10.3). El control de qualitat es porta a terme avaluant blancs i patrons de control per comprovar la robustesa, reproductibilitat i exactitud del mètode. La determinació dels límits de detecció (DL) i quantificació (QL) es realitza basant-se en la relació senyal/soroll. Es comparen els senyals mesurats de patrons a baixes concentracions dels analits amb el senyal de línia base i establint la mínima concentració a la qual l'analit pot ser detectat amb fiabilitat. Una relació senyal/soroll de 3 es considera acceptable per l'estimació del DL, i de 10 vegades per l'estimació del QL [7].

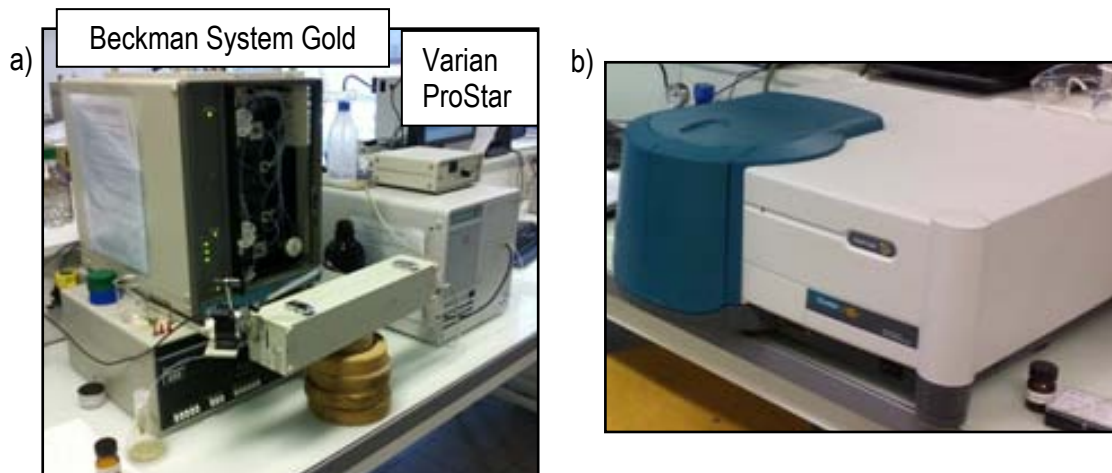


Figura 7. a) Cromatògraf de líquids Beckman System Gold 126 i espectrofotòmetre de fluorescència Varian ProStar, b) Espectrofotòmetre de fluorescència Cary eclipse ProStar

La columna utilitzada (Envirosep PP) és de sílice fosa C18 (150 mm x 4.6 mm x 5 μ m), i l'elució es porta a terme a un cabal temperatura constants d'1,0 mL \cdot min⁻¹ i 25 °C, respectivament. La fase mòbil està composta d'aigua i acetonitril i el gradient d'elució és el següent: des dels 0-3 min, la fase mòbil conté un 45 % d'acetonitril, seguit d'un increment lineal fins al 100 % d'acetonitril quan s'arriba als 10 min. Els paràmetres del detector així com els temps de retenció dels OH-PAHs es mostren a la Taula 2. Les longituds d'ona d'excitació i emissió es determinen prèviament utilitzant un espectrofotòmetre de fluorescència Cary eclipse ProStar (Figura 7b).

Taula 2. Programació de longituds d'ona en funció del temps de retenció i temps d'anàlisi dels OH-PAHs per HPLC/FLD

| Temps (min) | λ_{exc} (nm) | λ_{em} (nm) | OH-PAH | Temps de retenció (min) |
|-------------|----------------------|---------------------|----------|-------------------------|
| 0,0 | 222 | 351 | 2-OHNaph | 3,46 |
| 4,0 | 272 | 326 | 2-OHFlu | 5,37 |
| 6,0 | 248 | 383 | 9-OHPhe | 6,81 |
| 8,0 | 240 | 286 | 1-OHPyr | 8,66 |

2.6.4. CROMATOGRAFIA DE GASOS ACOBLADA A L'ESPECTROMETRIA DE MASSES (GC/MS)

La tècnica instrumental GC/MS s'aplica tant per l'anàlisi dels PAHs com per dels OH-PAHs en mostres de sòls

2.6.4.1. ANÀLISI DELS PAHs

L'anàlisi dels PAHs es porta a terme mitjançant 2 mètodes diferents, en funció del nombre de PAHs analitzats. En tots els casos s'utilitza el cromatògraf de gasos d'alta resolució TRACE GC ULTRA acoblat a un espectròmetre de masses DSQ II i l'automostrejador TRIPLUS AS de ThermoFisher Scientific (Figura 8).



Figura 8. Cromatògraf de gasos TRACE GC ULTRA amb l'espectròmetre de masses DSQ II i l'automostrejador TRIPLUS AS de ThermoFisher Scientific

Abans de cada jornada d'anàlisi es controla detalladament la relació aire/aigua (en la regió 10-100 m/z) per assegurar l'absència de fuites i el soroll de fons a la regió anomenada *Full scan* (45-560 m/z), per observar si hi ha contaminacions de la columna. També s'avalua la resposta del detector injectant el gas de calibratge (perfluorotributilamina, FC-43) i, per últim, es realitzen una sèrie de diagnòstics per verificar l'electrònica general. Abans de l'anàlisi de cada mostra es condiciona la xeringa del mostrejador automàtic amb 5,0 x 5,0 ($\pm 0,1$) μL de toluè i després de cada injecció es realitza un rentat amb tres cicles de 10,0 x 8,0 ($\pm 0,1$) μL d'acetona i tres cicles de 5,0 x 8,0 ($\pm 0,1$) μL de toluè.

El calibratge de l'instrument es porta a terme per mitjà de patrons sòlids dissolts en acetona, o bé a partir de mescleres comercials dels 16 PAHs classificats per la US EPA com a contaminants prioritaris. Com a patró intern s'utilitza el Phe-D₁₀, introduït a l'etapa prèvia d'extracció per microones dels components de la mostra, fins arribar a una concentració final d'1,000 mg·L⁻¹. Les determinacions analítiques s'efectuen per triplicat per la construcció de la recta de calibratge

o per duplicat per l'anàlisi dels PAHs en els microcosmos preparats (secció 2.10). El control de qualitat es porta a terme avaluant blancs i patrons de control per comprovar la robustesa, reproductibilitat i exactitud del mètode. La determinació dels límits de detecció (DL) i quantificació (QL) es realitza basant-se en la relació senyal/soroll. Es comparen els senyals mesurats de patrons a baixes concentracions dels analits amb el senyal de línia base i establint la mínima concentració a la qual l'analit pot ser detectat amb fiabilitat. Una relació senyal/soroll de 3 es considera acceptable per l'estimació del DL, i de 10 vegades per l'estimació del QL [7]. El software pel tractament de dades és el Xcalibur v.2.6.2., proporcionat per ThermoFisher Scientific.

El mètode utilitzat per l'anàlisi dels 6 PAHs emprats (Phe, Fluo, Pyr, Chry, BaA) durant la selecció del millor mètode d'extracció i purificació, consisteix en una modificació de les condicions del mètode recomanat per la US EPA, *Method 8270C: Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)* [8]. La separació es porta a terme amb una columna TRMS-5 de 30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm de gruix de film, 5 % fenilpolisilfenilensiloxà, connectada a una pre-columna de sílice fosa desactivada, 2 m x 0,32 mm I.D. a través d'un connector de quars universal. La programació del forn comença a 60 °C durant 5 min, i s'augmenta fins a 290 °C amb una rampa de 8 °C·min⁻¹, on es manté durant 2 min (al mètode de la US EPA 8270 C s'utilitza una programació del forn començant per una temperatura inicial de 40 °C (4 min) amb una rampa de 10 °C·min⁻¹ fins a 270 °C, mantinguda fins l'elució de l'últim PAH, que no separa eficientment els PAHs d'interès, motiu pel qual es modifica lleugerament de forma adient. La injecció d'1,0 (±0,1) µL es fa en mode *splitless* amb una xeringa SGE de 10,0 (±0,1) µL i agulla cònica de 80 mm, amb la vàlvula *split* tancada durant 1 min. El flux de gas portador, heli BIP, es manté constant a 1,5 mL·min⁻¹. La temperatura de l'injector, *transfer line* i la font d'ionització són de 275 °C, 300 °C i 225 °C, respectivament, i el mètode d'ionització emprat és per impacte electrònic (70 eV). L'adquisició dels cromatogrames es porta a terme primer en mode *Full Scan* (50-300 uma) per a la identificació i assignació de cadascun dels pics als PAHs corresponents, a partir del seu espectre de masses i la llibreria comercial del *National Institute of Standards and Technology* (NIST), instal·lada a l'instrument. Un cop identificats els diferents components, se seleccionen els ions representatius de cadascun dels PAHs per procedir a l'anàlisi en mode *Selected Ion Monitoring* (SIM), amb les masses i el temps de retenció de la Taula 3, sota un voltatge del multiplicador de 1100 V.

Taula 3. Temps de retenció i ions característics dels PAHs d'estudi

| PAH | Temps de retenció (min) | Ions principals |
|------------------|-------------------------|-----------------|
| Fenantè | 22,38 | 178, 179, 176 |
| Fluorantè | 25,96 | 202, 101, 203 |
| Pirè | 26,81 | 202, 200, 203 |
| Benz[a]Antracè | 30,28 | 228, 229, 226 |
| Crisè | 30,40 | 228, 226, 229 |
| Benz[b]Fluorantè | 33,30 | 252, 253, 125 |

Per altra banda s'utilitza un segon mètode tant per l'anàlisi dels 16 PAHs que la US EPA considera com a contaminants prioritaris com dels 5 PAHs seleccionats pels estudis de degradació (apartat de resultats i discussió, secció 3.4). Amb el mateix instrument, es mantenen la majoria de paràmetres experimentals amb l'excepció de la programació del forn, que en aquest cas parteix de 60 °C durant 5 min, i s'augmenta fins a 310 °C amb una rampa de 8 °C·min⁻¹, on es manté durant 10 min. En aquest cas, l'adquisició dels cromatogrames es fa també primer en mode *Full Scan* i després en mode *Selected Ion Monitoring* (SIM), amb les masses dels ions característics i el temps de retenció de la Taula 4, sota un voltatge del multiplicador de 1100 V.

Taula 4. Temps de retenció i ions característics dels PAHs d'estudi

| PAH | Temps de retenció (min) | Ions principals |
|--------------------------|-------------------------|-----------------|
| Naftalè | 12,48 | 128, 129, 127 |
| Acenaftilè | 17,32 | 152, 151, 153 |
| Acenaftè | 17,84 | 154, 153, 152 |
| Fluorè | 19,41 | 166, 165, 167 |
| Fenantrè-D ₁₀ | 22,28 | 188 |
| Fenantrè | 22,30 | 178, 179, 176 |
| Antracè | 22,45 | 178, 176, 179 |
| Fluorantè | 25,88 | 202, 101, 203 |
| Pirè | 26,54 | 202, 200, 203 |
| Benzo(a)Antracè | 30,18 | 228, 229, 226 |
| Crisè | 30,29 | 228, 226, 229 |
| Benzo(b)Fluorantè | 33,20 | 252, 253, 125 |
| Benzo(k)Fluorantè | 33,28 | 252, 253, 125 |
| Benzo(a)Pirè | 34,05 | 252, 253, 125 |
| Indeno(1,2,3-cd)Pirè | 36,70 | 276, 138, 277 |
| Dibenzo(a,h)Antracè | 36,77 | 278, 139, 279 |
| Benzo(g,h,i)Perilè | 37,35 | 276, 138, 277 |

2.6.4.2. ANÀLISI DELS OH-PAHs

Per l'anàlisi dels OH-PAHs mitjançant GC/MS s'utilitza un cromatògraf de gasos d'alta resolució, model 6850 acoblat a un espectròmetre de masses, model 5975C, d'Agilent (Figura 9). Abans de l'anàlisi es porta a terme una etapa de derivatització de la mostra per tal d'augmentar-ne l'estabilitat tèrmica i amb l'objectiu de millorar la sensibilitat i el rendiment cromatogràfic de l'anàlisi. Consisteix en prendre 940,0 ($\pm 0,5$) μL de l'extracte líquid del MAE i afegir-hi 50,000 ($\pm 0,025$) μL de N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida com a agent derivatitzant, per dur a terme la sililació dels OH-PAHs. A continuació s'introdueix a un bany de silicona a 60 °C amb constant agitació durant 30 min.



Figura 9. Cromatògraf de gasos, model 6850 i espectròmetre de masses, model 5975C, d'Agilent

Abans de la injecció manual de cada mostra al cromatògraf es condiona la xeringa amb $3,0 \times 5,0 (\pm 0,1) \mu\text{L}$ de diclorometà i després de cada injecció es realitza un rentat amb $3,0 \times 10,0 (\pm 0,1) \mu\text{L}$ de diclorometà. El calibratge de l'instrument es porta a terme per mitjà de patrons sòlids dels OH-PAHs dissolts en acetonitril. Com a patró intern s'utilitza el Phe-D₁₀, introduït a l'etapa prèvia a l'anàlisi dels components de la mostra, durant el procés de sililació, per arribar a una concentració final d' $1,000 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Les determinacions analítiques s'efectuen per triplicat per la construcció de la recta de calibratge o per duplicat per l'anàlisi dels OH-PAHs en els microcosmos preparats (secció 2.10.1). El control de qualitat es porta a terme avaluant blancs i patrons de control per comprovar la robustesa, reproductibilitat i exactitud del mètode. La determinació dels límits de detecció (DL) i quantificació (QL) es realitza basant-se en la relació senyal/soroll. Es comparen els senyals mesurats de patrons a baixes concentracions dels analits amb el senyal de línia base i establint la mínima concentració a la qual l'analit pot ser detectat amb fiabilitat. Una relació senyal/soroll de 3 es considera acceptable per l'estimació del DL, i de 10 vegades per l'estimació del QL [7]. El software pel tractament de dades és el MSD Chem Station E.02.00.493, proporcionat per Agilent Technologies.

La separació es porta a terme amb una columna J&W, HP-5MS 5 % fenilmetilpolisiloxà de $50 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm I.D.}$, $0,25 \mu\text{m}$ de gruix de film. La programació del forn comença a $55 \text{ }^\circ\text{C}$ durant 1 min, i s'augmenta fins a $180 \text{ }^\circ\text{C}$ amb una rampa de $40 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, seguit d'un segon increment fins a $300 \text{ }^\circ\text{C}$ a un ritme de $4,3 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. La injecció d' $1,0 (\pm 0,1) \mu\text{L}$ es fa en mode *splitless* amb una xeringa Hamilton S700 de $10,0 (\pm 0,1) \mu\text{L}$ i agulla cònica de 80 mm, amb la vàlvula *split* tancada durant 1 min. El flux de gas portador, heli, es manté constant a $1,3 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. La temperatura de l'injector, *transfer line* i la font d'ionització són de $280 \text{ }^\circ\text{C}$, $300 \text{ }^\circ\text{C}$ i $280 \text{ }^\circ\text{C}$, respectivament, i el

mètode d'ionització emprat és per impacte electrònic (70 eV). L'adquisició dels cromatogrames es va fer en mode *Selected Ion Monitoring* (SIM), amb les masses dels ions característics i el temps de retenció de la Taula 5, sota un voltatge del multiplicador de 1800 V.

Taula 5. Temps de retenció i ions característics dels OH-PAHs d'estudi

| OH-PAHs | Temps de retenció (min) | Ions principals dels OH-PAHs |
|---|-------------------------|------------------------------|
| Solvent | 0 - 6,5 | 0 |
| Phe-D ₁₀ , naftols sililats, fluorenols sililats, naftalendiols disililats | 6,5-12,0 | 188, 216, 254, 304 |
| hidroxifluorens sililats i hidroxifluorendiols disililats | 12,0-14,0 | 254, 342 |
| Fenantrols sililats i fenantrendiols disililats | 14,0-20,0 | 266, 354 |
| Hidroxipirens sililats, hidroxibenzo(a)pirens sililats i hidroxipirendiols disililats | 20,0-25,0 | 290, 340, 378 |

2.7. MOSTRES ANALITZADES

En aquest treball d'investigació es porten a terme estudis amb 5 tipus de mostres de sòl. Per una banda, un CRM representatiu d'una matriu de sòl que s'utilitza per validar la metodologia utilitzada per a l'anàlisi dels PAHs i, d'altra banda, mostres de sòl del voral de l'autopista C-58 (Terrassa-Sant Quirze del Vallès), mostres de sòl d'una zona de conreu i pastura a Yvetot (França), mostres de sòl d'un camp de blat a Polinyà, i mostres de sòl al voral del riu Ripoll, a Sabadell.

En aquesta secció es descriuen les característiques del CRM, el procediment de presa de mostra seguit, i el pre-tractament de mostra aplicat en cada cas, així com la zona exacte de procedència de les diferents mostres de sòl recollides.

2.7.1. DESCRIPCIÓ DE LES MOSTRES

A continuació es fa una breu descripció dels tipus de mostres utilitzades al llarg d'aquesta tesi doctoral per tal de portar a terme els objectius plantejats, incloent la descripció del CRM utilitzat, de les mostres de sòls recollides a la comarca del Vallès Occidental (Catalunya) i la mostra d'Yvetot, a França.

- ✓ **CRM 115-100: *Semi-VOAs in Soil***. El CRM s'adquireix a RTC (Wyoming, USA) i fou recollit a la regió oest dels Estats Units. Se subministra en un envàs de vidre ambre amb tancat hermètic de tefló i conté aproximadament 100 g de sòl de pH 6,8 contaminat amb PAHs. El sòl es troba esterilitzat per minimitzar la degradació del contingut de la mostra i també tamisat < 150 µm. La seva selecció es duu a terme tenint en compte tant pel seu contingut com pel tipus de matriu ambiental (sòl), la qual cosa permet aconseguir una similitud propera a la de les mostres d'estudi recollides. D'aquesta manera es poden reproduir els problemes de preparació de mostra, d'interferències analítiques, etc., que apareixen sovint durant l'anàlisi de mostres sòlides similars.

El certificat d'anàlisi rigorós informa de la identificació, quantificació i certificació de 10 compostos, i la semi-quantificació de 2 d'addicionals de caràcter informatiu. La mostra fou analitzada per 20 laboratoris independents seguint els requeriments especificats a l'EPA/AALA RM-03, guies ISO 34:2009, 35:2009 i ISO 17025. Els valors dels PAHs a les mostres, recollits a la Taula 6, han estat certificats seguint dos dels mètodes recollits a la US EPA SW846, en concret pels mètodes de 3560C (Soxhlet) i 3550B (ulltrasons), i l'anàlisi instrumental mitjançant el mètode US EPA 8270C (*Semivolatile organics by GC/MS*). El subministrador informa que l'ús d'aquest CRM és adequat pels mètodes d'extracció mencionats anteriorment i per altres de similars.

Els valors de la Taula 6 que es troben entre parèntesi no estan certificats i són només de caràcter informatiu. Els valors de concentració certificats estan expressats sobre pes de mostra de sòl seca. L'interval de confiança i el de predicció van ser calculats al 95 % de confiança seguint les pautes dels documents de la US EPA prèviament citats. Segons la informació del subministrador, els laboratoris que utilitzin exactament el mateix procediment haurien de trobar el valor vertader dins l'interval de confiança i aquells que ho facin per mètodes similars, haurien de trobar els valors dins l'interval de predicció.

Taula 6. Concentracions dels analits del CRM 115-100

| Compost | Valor de referència ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) | Desviació estàndard | Interval de confiança | Interval de predicció |
|----------------------------|--|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| Naftalè | 1340 | 290 | 1210-1470 | 720-1960 |
| Acenaftè | 4600 | 1080 | 4060-5150 | 2270-6940 |
| Benzo(a)Antracè | 12100 | 2670 | 10800-13300 | 6310-17800 |
| Benzo(b)Fluorantè | 930 | 250 | 810-1040 | 390-1460 |
| Crisè | 16800 | 4960 | 14500-19000 | 6150-27400 |
| Dibenzofuran | 10600 | 2530 | 9270-11900 | 5060-16100 |
| Fluorantè | 22100 | 4750 | 19800-24500 | 11900-32300 |
| Fluorè | 13000 | 3650 | 11400-14600 | 5190-20800 |
| Fenantrè | 80 | 10 | 70-90 | 60-100 |
| Pirè | 7660 | 1980 | 6780-8540 | 3440-11900 |
| Antracè | (40) | | | |
| Bis(2-ethylhexyl)phthalate | (300) | | | |

A part de l'ús d'un CRM, s'ha portat a terme la presa de mostra a diferents punts del Vallès Occidental (Catalunya), marcats a la Figura 10, descrits de forma detallada a continuació.



Figura 10. Mapa dels municipis de la comarca del Vallès Occidental (Catalunya) on s'ha portat a terme la presa de mostra

- ✓ **Mostra de Polinyà.** La mostra es recull al nord del terme municipal de Polinyà (Latitud N41°33'54,73"-Longitud E2°8'41,53"), situat entre Sabadell (6 km) i Palau Solità i Plegamans (7 km), a la comarca del Vallès Occidental. En concret, es recollí a la vora d'un camí de sorra proper a una granja cunícola, enmig d'una zona fonamentalment dedicada al conreu de blat, rodejada d'àrees d'arbrat dens, matollars, prats i herbassars, tal i com es mostra a la Figura 11. L'àrea de presa de mostra es troba a 1-2 km d'un polígon industrial dedicat principalment a la metal·lúrgia i és una zona poc freqüentada per vehicles, majoritàriament tractors. La zona de presa de mostra es troba delimitada per l'oest per la riera de Polinyà a 250 m, i pel sud per la carretera C-155 a 400-500 m.

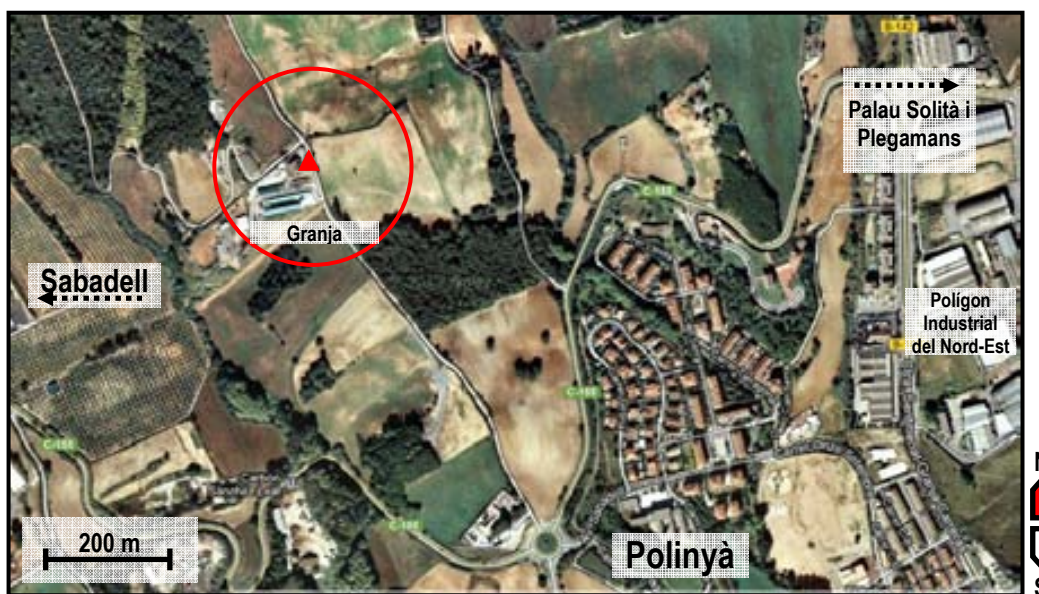


Figura 11. Àrea de presa de mostra al terme municipal de Polinyà

- ✓ **Mostra de Sabadell.** La mostra es recull al sud del terme municipal de Sabadell (Latitud N41°31'57,62"-Longitud E2°7'35,06"), flanquejat pels municipis de Polinyà, Barberà, Castellar, Sant Quirze, Badia, i Cerdanyola del Vallès (3-10 km), a la comarca del Vallès Occidental. En concret, es recollí al voral del riu Ripoll, prop del complex esportiu de Sant Oleguer, enmig d'una zona fonamentalment dedicada al conreu de blat, rodejada d'àrees d'arbrat no massa dens, sobretot bosc de ribera, tal i com es mostra a la Figura 12. L'àrea de presa de mostra es troba a 1-2 km del polígon industrial Can Roqueta i és una zona poc freqüentada per vehicles, principalment pagesos que accedeixen als seus horts. La zona de presa de mostra es troba delimitada directament pel riu Ripoll per l'est, i el barri de Les Termes de Sabadell a 200-300 m per l'oest.



Figura 12. Àrea de presa de mostra al terme municipal de Sabadell

- ✓ **Mostra de Sant Quirze.** La mostra es recull al nord del terme municipal de Sant Quirze (Latitud $N41^{\circ}32'36,19''$ - Longitud $E2^{\circ}4'14,12''$), a les immediacions de l'autopista C-58, entre els quilòmetres 14 i 15, en sentit nord, al costat dret de la calçada. Com s'observa a la Figura 13, es tracta d'una petita zona amb arbrat dens, caracteritzada sobretot per la proximitat a l'autopista, amb una alta densitat de circulació de vehicles, que juntament amb un conjunt de camps dedicats al conreu delimiten l'àrea de presa de mostra pel nord. A més, pel sud, es troba delimitada per la zona urbanitzada de Sant Quirze, a 1 km.



Figura 13. Àrea de presa de mostra al terme municipal de Sant Quirze, a l'autopista C-58

- ✓ **Mostra de Terrassa.** La mostra es recull a l'àrea de la gasolinera del quilòmetre 17, a les immediacions de l'autopista C-58 (Latitud N41°32'34,44"-Longitud 2°3'3,45"), en sentit nord, al costat dret de la calçada. En concret, es recollí a l'entrada de la gasolinera, a una zona coberta amb matollars i herbes. Com s'observa a la Figura 14, la zona de presa de mostra es troba flanquejada per àrees dedicades al conreu tant pel nord com pel sud, així com per l'àrea urbanitzada de Terrassa a 5 km al nord-oest, el polígon industrial Santa Margarita i Can Parellada a 2 km a l'oest, i per l'autopista C-58 i el terme municipal de Sant Quirze a 5,5 km al sud. És una zona altament freqüentada per vehicles, ja que està dedicada al proveïment de combustible.



Figura 14. Àrea de presa de mostra al terme municipal de Terrassa, a l'autopista C-58

Per últim, es descriuen les característiques del darrer sòl d'estudi, el qual fou recollit a Yvetot (França).

- ✓ **Mostra Yvetot.** La mostra es recull a l'Institut Agrícola i Agroalimentari d'Yvetot, França (*Lycée Agricole et Agro-alimentaire d'Yvetot*), població situada al nord de l'Alta Normandia (Latitud N49°36'40,33"-Longitud 0°44'10,34"). Tal i com es mostra a la Figura 15, es recollí al bell mig d'un prat, zona fonamentalment dedicada a la pastura d'animals, rodejada d'àrees dedicades exclusivament al conreu. L'àrea de presa de mostra a Yvetot es troba aïllada d'altres petites poblacions, que se situen a un radi de > 12 km, força lluny de potencials fonts de contaminació. La zona és poc freqüentada per vehicles, majoritàriament tractors.



Figura 15. Àrea de presa de mostra al terme municipal d'Yvetot

2.7.2. PRETRACTAMENT I CONSERVACIÓ DE LES MOSTRES

- ✓ **CRM.** El CRM es conserva a 4-5 °C seguint les recomanacions del fabricant. Abans de l'anàlisi, es mescla intensament per assegurar la seva homogeneïtat i evitar possibles disposicions irregulars per estratificació del sòl durant les etapes de transport, manipulació i conservació. A continuació s'asseca a 35 °C durant una nit i es procedeix a la pesada per dur a terme les extraccions Soxhlet i per microones.

- ✓ **Mostres Polinyà, Sabadell, Sant Quirze, Terrassa, Yvetot.** Les mostres es van recollir el mes de febrer 2012 (Yvetot), i el mes de juliol de 2012 i abril del 2013 (Polinyà, Sabadell, Terrassa i Sant Quirze). Per assegurar una presa de mostra representativa, se segueix una estratègia basada en un model aleatori sistemàtic. Pels casos dels sòls recollits al Vallès Occidental, a causa de l'accessibilitat al terreny, la presa de mostra es porta a terme en format lineal, és a dir, seleccionant un punt inicial fix, a partir del qual es recullen dues mostres primàries a la dreta i dues a l'esquerra, equidistants 1 m entre elles (en total 5 mostres primàries) d'aproximadament 2 kg cadascuna, amb una profunditat de 20 cm. Un cop recollides les mostres primàries, es van ajuntar per formar una mostra agregada, d'uns 10 kg aproximadament. Pel cas d'Yvetot, en tractar-se d'una zona àmplia i de fàcil accés, se selecciona punt central fix a partir del qual es recullen quatre mostres primàries, en format diagonal, equidistants 10 m entre elles. Per a cada punt de presa de mostra es raspalla

suaument la superfície del sòl amb un raspall de niló, per eliminar el màxim possible la presència de matèria orgànica i pedres de gran mida. A continuació, amb una pala, adequadament protegida per tal d'evitar la contaminació del sòl amb metalls, es va extreure cadascuna de les mostres primàries. Pel cas d'Yvetot, en tractar-se d'una zona àmplia i de fàcil accés, se selecciona punt central fix a partir del qual es recullen quatre mostres primàries, en format diagonal, equidistants 10 m entre elles. La resta de la presa de mostra es porta a terme de la mateixa manera.

La mostra es transporta al laboratori en contenidors de polietilè i es tamisa per sota de 2 mm per tal d'assegurar una mida de partícula apta per a l'extracció per microones, lliure de pedres i residus orgànics. A continuació s'homogeneïtza intensament i se seleccionen diferents submostres per a la caracterització d'aquestes. Es determinen la humitat, pH, conductivitat, matèria orgànica, carbonats, capacitat màxima de retenció d'aigua, metalls pesants i unitats formadores de colònies. Finalment, un altre grup de submostres es destinen a la preparació dels microcosmos[‡], les quals es conserven a una caixa de polietilè, en condicions controlades d'humitat i temperatura i airejades per tal de mantenir l'activitat biològica de les mateixes.

2.8. CARACTERITZACIÓ DE LES MOSTRES

El coneixement de les característiques del sòl d'estudi és molt important per a l'anàlisi, el disseny i la preparació de proves i estudis relacionats amb el mateix. A més, la informació extreta de la caracterització del sòl permet la seva classificació i, sovint, ajuda a relacionar els resultats analítics obtinguts de les diverses proves dutes a terme al sòl amb les hipòtesis formulades a priori. Per aquest motiu, es porta a terme la caracterització d'alguns paràmetres edafològics del sòl, mitjançant cadascuna de les determinacions per quintuplicat, amb les excepcions de la determinació de metalls pesants i de la preparació dels cultius microbiològics que es fan per triplicat i duplicat, respectivament.

[‡] Els microcosmos consisteixen en una reproducció experimental del medi natural a escala de laboratori (secció 2.10 i, a la introducció, a la secció 1.8)

2.8.1. HUMITAT

Per conèixer el percentatge d'humitat d'un sòl es pesen amb precisió 3,50000 g de mostra recent recollida i tamisada i, a continuació, s'asseca a 115 °C durant 24 h [9]. Es deixa refredar al dessecador i es porten a terme pesades successives fins assolir pes constant. S'entén per pes constant al pes assolit quan, durant el procés d'assecat, la diferència entre dues pesades successives de la mostra freda, amb un interval de 4 h entre elles, no excedeix el 0,1 % de l'últim pes determinat. El càlcul del contingut d'aigua es fa per diferència de pesos abans i després d'assecar, en relació a la mostra humida (percentatge d'humitat sobre sòl humit) o seca (percentatge d'humitat sobre sòl sec).

2.8.2. pH

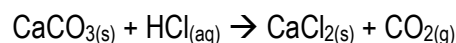
La determinació del pH de les mostres de sòl s'efectua mitjançant la mesura potenciomètrica de l'extracte d'una mescla sòl:aigua 1:2,5 agitada durant 30 min [10,11].

2.8.3. CONDUCTIVITAT ELÈCTRICA

La determinació de la conductivitat elèctrica (EC) s'efectua mitjançant la mesura conductimètrica de l'extracte centrifugat (2500 rpm durant 15min) i filtrat (PVDF <0,22 µm) d'una mescla sòl:aigua (1:10), agitada mecànicament durant 2 h [10,11].

2.8.4. PERCENTATGE DE CARBONATS

La quantitat de carbonat de calci es determina a través de la mesura del CO₂ que es genera a partir de la reacció següent mitjançant l'ús d'un calcímetre (Figura 16):



Est tracta d'un sistema basat en un matràs de fons rodó de tres boques en què en una d'elles s'introdueixen 1,50000 g de sòl pesats amb precisió, per una altra boca s'acobla a una xeringa amb HCl al 10 % (v/v) i a la tercera boca es connecta un tub connectat a una bureta invertida plena d'aigua, enrasada a una marca concreta. Tot el sistema es troba tancat, sense possibilitat d'escapada d'aire a l'exterior. D'aquesta manera, el volum de CO₂ després en la reacció

desplaça l'aigua de la bureta i es pot llegir la nova mesura, indica del volum de gas format. A partir d'aquesta dada i mitjançant l'equació dels gasos ideals ($PV=nRT$), es determina, de manera aproximada, el percentatge de carbonats.



Figura 16. Muntatge experimental d'un calcímetre

2.8.5. MATÈRIA ORGÀNICA

El contingut en matèria orgànica (OM) es determina en mostres de sòls assecats prèviament a 115 °C durant 24 h. Es pesen amb precisió 2,50000 g de mostra i, a continuació, es calcina a 500 °C durant 4 h per descompondre tota la matèria orgànica. Es deixa refredar al dessecador i es porten a terme pesades successives fins assolir pes constant. El percentatge de matèria orgànica s'expressa respecte el pes de mostra seca [11].

2.8.6. CAPACITAT MÀXIMA DE RETENCIÓ D'AIGUA

Per a la determinació de la màxima capacitat de retenció d'aigua del sòl (MWHC) es prenen aproximadament 250 grams de sòl, assecats prèviament a 115 °C durant 24 h i s'introdueixen en un recipient cilíndric amb petits orificis al fons. Se satura el sòl amb aigua i es deixa reposar durant 4 h. Es prenen alíquotes del sòl saturat, i es determina la quantitat d'aigua present al mateix seguint el mateix procediment dut a terme en la determinació de la humitat (secció 2.8.1).

2.8.7. METALLS PESANTS

La determinació de la fracció total de metalls pesants (HM), és a dir, la quantitat total de HM present al sòl, és representativa de totes les formes químiques en què s'hi poden trobar

(associats a compostos de naturalesa orgànica, com a part de la estructura intrínseca de minerals, etc.). La determinació de la concentració total en estudis relacionats amb el comportament de HM significa que totes les formes d'un metall en concret es consideren amb igual impacte sobre l'ambient i amb un comportament similar en el cicle biogeoquímic. Aquesta simplificació és acceptable a llarg termini però és inadequada per a processos a curt termini. Per això, és important discriminar les diferents localitzacions dels elements en les diferents fases del sòl [12]. Així, en el cas d'estudi, interessa conèixer també la biodisponibilitat, que es defineix com aquells HM que poden ser incorporats o són accessibles pels microorganismes, tant pel desenvolupament del seu metabolisme com per la inhibició del mateix.

2.8.7.1. FRACCIÓ TOTAL

La fracció total es determina mitjançant la tècnica instrumental PF-XRF. Donat que les mostres es troben tamisades per sota de 2 mm, només cal preparar les càpsules corresponents per l'anàlisi directa de les mateixes, tal i com s'explica a la secció 2.6.1.

2.8.7.2. FRACCIÓ BIODISPONIBLE

Per la determinació de la fracció biodisponible s'ha considerat l'ús d'extraccions simples amb dos tipus extractants diferents: H₂O i MgCl₂. L'ús d'aigua representa la fracció hidrosoluble i conté les espècies solubles en aquesta, fonamentalment ions lliure o complexats per la matèria orgànica soluble i altres constituents. Es determina mitjançant l'anàlisi per ICP/MS (segons el procediment descrit a la secció 2.6.2) de l'extracte centrifugat (2500 rpm durant 15 min) i filtrat (PVDF < 0,22 µm) d'una mescla sòl:aigua (1:5) agitada mecànicament a temperatura ambient durant 2 h [13]. L'ús del MgCl₂ representa la fracció intercanviable, la qual conté els metalls retinguts a la superfície del sòlid per interaccions electrostàtiques relativament febles i els metalls que poden ser alliberats per processos d'intercanvi iònic. Es determina mitjançant l'anàlisi de l'extracte centrifugat (2500 rpm durant 15 min) i filtrat (PVDF < 0,22 µm) d'una mescla sòl:MgCl₂ 0,1 M (1:8) agitada mecànicament a temperatura ambient durant 1 h [14].

2.8.8. DETERMINACIÓ DE LES UNITATS FORMADORES DE COLÒNIES (CFU)

Per la determinació de les CFU, es prepara una sèrie de plaques de Petri amb un medi de cultiu apte pel creixement dels bacteris i s'hi introdueix un extracte aquós del sòl (que conté els

bacteris), operació anomenada sembrat. A continuació, s'incuba una nit a una temperatura controlada, òptima pel desenvolupament dels microorganismes. Després de la incubació es procedeix al recompte de les CFU. Cadascun dels sembrats es porta a terme per duplicat. És una prova de caràcter microbiològic, i cal tenir en compte que s'ha d'esterilitzar el material utilitzat al llarg de tot el procediment experimental per evitar contaminacions.

Per preparar el medi de cultiu, es pesen 24 g de *Tryptic soy agar* (TSA), es dissolen en 600 mL d'aigua i es porta a ebullició sota agitació, durant 2 min. S'utilitza l'autoclau (Figura 17a) per esterilitzar tant el medi de cultiu preparat com la resta de material necessari per dur a terme l'extracció dels bacteris del sòl i el sembrat. L'autoclau es programa a una temperatura de 120 °C durant 20 min. Un cop esterilitzat el material, es procedeix a omplir les diferents plaques de Petri amb el medi de cultiu preparat (Figura 17b) i es deixa al llarg d'una nit per tal que solidifiqui i poder procedir a l'extracció i sembrat.

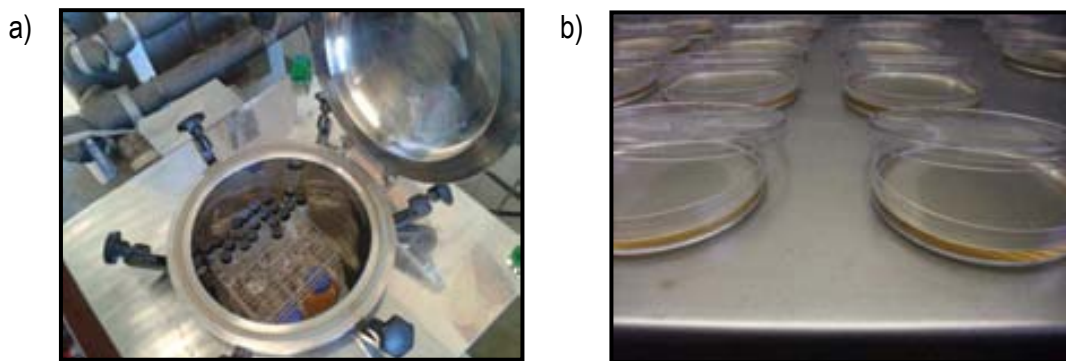


Figura 17. a) Autoclau, b) Plaques de Petri amb el medi de cultiu

Per l'extracció dels bacteris del sòl es pesa 1,0000 ($\pm 0,0001$) g de sòl i s'introdueixen en 100 (± 1) mL d'aigua destil·lada (també esterilitzada), tot agitant durant 30 min. D'aquest extracte aquós se'n preparen diferents dilucions, en medi Ringer[§] (pH=7,3), per procedir al sembrat (Figura 18). Com que es desconeix el nombre de CFU que conté el sòl, el nombre de bacteris que poden créixer a cadascuna de les plaques pot arribar a ser molt elevat, cosa que pot dificultar el recompte. Aquesta és la raó per la qual es preparen les diferents dilucions ja que es recomana seleccionar les plaques amb un màxim de 300 CFU per tal d'assegurar un bon recompte. Un cop preparades les diferents dilucions es porta a terme el sembrat, afegint a cada

[§] La solució Ringer és una solució salina que conté clorur de sodi, clorur de potassi, clorur de calci i clorur de magnesi, utilitzada en cultius cel·lulars i bacterians i que permet obtenir un medi iònic apte per a la supervivència dels microorganismes.

placa de Petri 0,100 ($\pm 0,005$) mL de l'extracte diluït en Ringer i s'escampa homogèniament amb l'ajut d'una nansa Digrasky. Un cop sembrades totes les plaques de Petri, s'incuben a 30 °C durant 48 h i es procedeix al recompte de les CFU.

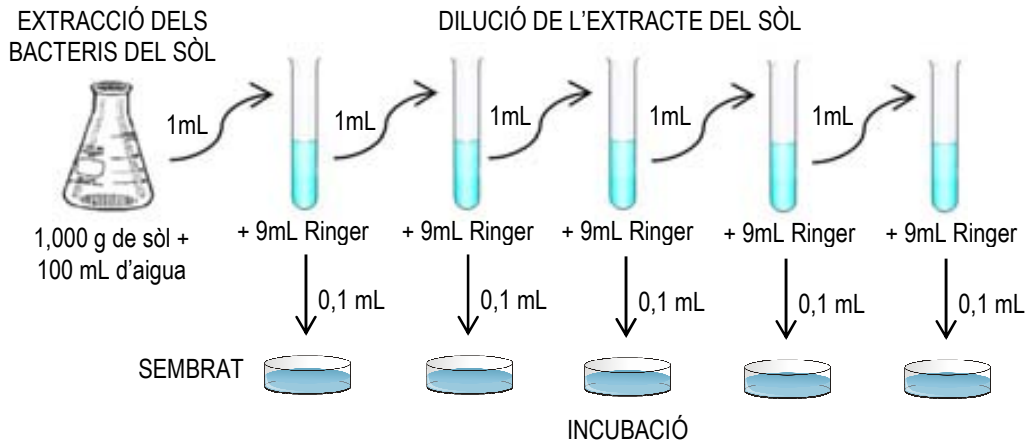


Figura 18. Esquema de les etapes necessàries per dur a terme el sembrat de les plaques de Petri a partir de l'extracció dels bacteris del sòl

2.9. DOPATGE DE SÒLS

Per dur a terme alguns dels estudis d'aquesta tesi s'ha hagut de dopar el sòl amb diferents compostos. A continuació s'explica quin ha estat el procediment dut a terme.

2.9.1. DOPATGE DEL SÒL D'YVETOT AMB OH-PAHs

Pel desenvolupament de la nova metodologia d'anàlisi d'OH-PAHs (apartat de resultats i discussió, secció 3.2), es dopa una part del sòl recollit i tamisat a Yvetot amb tres compostos representatius de dos, tres i quatre anells benzènics (el 2-OHNaph, el 9-OHPhe i l'1-OHPyr, respectivament). El sòl s'esterilitza prèviament a l'autoclau (a 120 °C durant 20 min) per tal d'evitar la degradació dels OH-PAHs introduïts durant les optimitzacions de les diferents etapes de la nova metodologia. Tot seguit s'asseca a 35 °C durant 24 h, es moltura suaument i es dopa amb una solució que conté els OH-PAHs representatius fins arribar a una concentració al sòl de 0,200 mg·kg⁻¹ de cadascun d'ells. El sòl dopat es manté en agitació constant durant 24 h per tal de distribuir els OH-PAHs per tota la matriu i es protegeix de la llum solar per tal d'evitar la fotooxidació dels analits introduïts. Finalment, es deixa reposar durant 24 h més abans de la seva anàlisi.

2.9.2. DOPATGE DEL SOL DE SABADELL AMB METALLS PESANTS

El sòl de Sabadell es dopa per dur a terme un estudi microbiològic preliminar abans de la preparació de microcosmos emprats en l'estudi de la influència de diferents concentracions de HM en la degradació dels PAHs (apartat de resultats i discussió, secció 3.4.3.1). A una part de la mostra de sòl de Sabadell, s'introdueixen diferents concentracions de HM per tal de comprovar si el creixement de les diferents comunitats bacterianes es veu afectat significativament.

Per procedir al dopatge es preparen diferents recipients de vidre amb 100,0 g ($\pm 0,1$) de sòl nadiu** humit als quals s'hi introdueixen 22,10 ($\pm 0,1$) mL d'aigua milli-Q esterilitzada, ajustada a pH=7 i amb diferents concentracions de HM, per arribar als valors indicats a la Taula 7. Es preparen, doncs, 9 recipients de vidre, 8 d'ells amb diferents nivells de HM i 1 sense dopar (representant el contingut de HM inicial del sòl). Aquestes concentracions es trien en funció dels resultats obtinguts de l'anàlisi del contingut de HM biodisponible al sòl, analitzats per ICP/MS, explicat a l'apartat de discussió i resultats, secció 3.4.3. Finalment, s'homogeneïtza i es deixa reposar durant 4 dies per tal que els bacteris entrin en contacte amb els HM introduïts.

Taula 7. Concentracions introduïdes ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) dels diferents metalls pesants als sòls de Sabadell per l'estudi preliminar de creixement microbiològic

| ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) | Cr | Mn | Co | Ni | Cu | Zn | Pb | ΣHM |
|------------------------------------|-------|-------|--------|--------|-------|-------|-------|-------------------|
| No dopat (nadiu) | - | - | - | - | - | - | - | - |
| x2 | 0,150 | 0,500 | 0,0100 | 0,0500 | 0,250 | 0,500 | 0,150 | 1,61 |
| x5 | 0,600 | 2,00 | 0,0400 | 0,200 | 1,00 | 2,00 | 0,600 | 6,44 |
| x10 | 1,35 | 4,50 | 0,0900 | 0,450 | 2,25 | 4,50 | 1,35 | 14,5 |
| x50 | 7,35 | 24,5 | 0,490 | 2,45 | 12,3 | 24,5 | 7,35 | 78,9 |
| x100 | 14,9 | 49,5 | 0,990 | 4,95 | 24,8 | 49,5 | 14,9 | 160 |
| x250 | 37,4 | 125 | 2,49 | 12,5 | 62,3 | 125 | 37,4 | 402 |
| x500 | 74,9 | 250 | 4,99 | 25,0 | 125 | 250 | 74,9 | 805 |
| x1000 | 150 | 500 | 9,99 | 50,0 | 250 | 500 | 150 | 1610 |

** Sòl nadiu significa no s'ha esterilitzat i que manté les propietats fisicoquímiques inicials i conserva l'activitat microbiològica

El dopatge dels sòls amb PAHs s'ha portat a terme exclusivament durant la preparació dels tres tipus de microcosmos utilitzats en aquest treball, motiu pel qual es descriu de forma detallada per a cadascun dels casos a la següent secció 2.10.

2.10. MICROCOSMOS

Els microcosmos consisteixen en una reproducció experimental del medi natural a escala de laboratori. Es prepararen en recipients de vidre amb tancament hermètic a partir de la mostra de sòl recollida i cadascun d'ells està format per un total aproximat de 100,0 g de sòl a partir de 10,0 ($\pm 0,1$) g de sòl estèril sec i més de 90,0 ($\pm 0,1$) g de sòl nadiu humit (equivalents a 90 g de sòl sec corregit amb la humitat). El resultat final de la preparació dels microcosmos es mostra a la Figura 19.

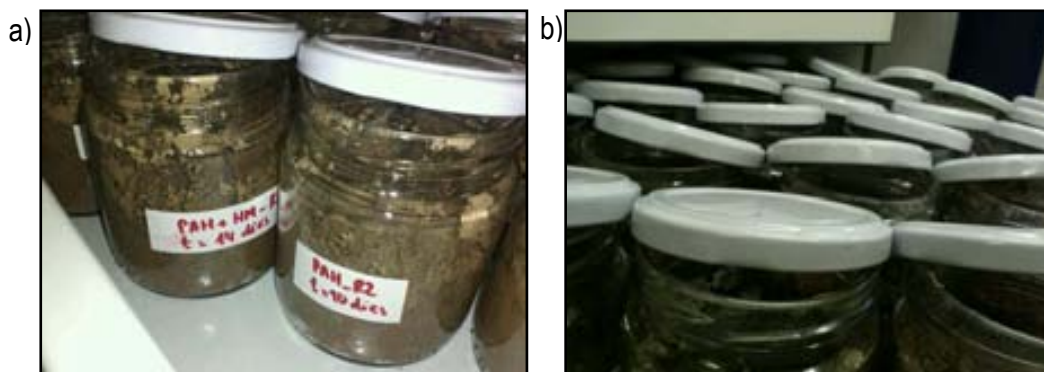


Figura 19. a) Aspecte d'alguns dels microcosmos preparats, b) Conservació dels diferents microcosmos preparats lleugerament destapats

Al llarg d'aquesta tesi doctoral es preparen microcosmos a partir de dos sòls diferents, els quals es doparan amb PAHs o amb PAHs i HM en funció dels objectius dels estudis realitzats, tal i com es descriu a continuació.

2.10.1. MICROCOSMOS PREPARATS A PARTIR DEL SÒL D'YVETOT

Es preparen dos grups de microcosmos per comprovar l'aplicabilitat de la nova metodologia d'anàlisi dels OH-PAHs (desenvolupada a l'apartat de discussió i resultats, secció 3.2). Per fer-ho, una part del sòl d'Yvetot s'esterilitza, s'asseca a 35 °C durant 24 h, es moltura i es divideix en dues porcions. Una de les porcions es dopa amb Fenantrè (Phe) fins a una concentració de 30.000 mg·kg⁻¹ i l'altra amb una mescla de 7 PAHs dissolts en acetona (Phe, Fluo, Pyr, BbF,

BkF, BaP i B(g,h,i)P) fins a arribar a una concentració total de 3.000 mg·kg⁻¹). A continuació, els sòls dopats s'homogeneïtzen durant 48 h per distribuir els PAHs per tota la matriu i per evaporar l'acetona. Després d'una setmana d'estabilització, 10,0 (±0,1) g d'aquest sòl dopat es mesclen amb més de 90,0 (±0,1) g de sòl nadiu humit i s'homogeneïtzen per a l'obtenció dels microcosmos. Així doncs, el microcosmos anomenat E1 consisteix en 120,8 (±0,1) g de sòl nadiu humit (equivalents a 90,0 g de sòl sec) i 10,0 (±0,1) g de sòl estèril sec enriquit amb Phe obtenint, doncs, una concentració final de 3.000 mg·kg⁻¹. El microcosmos anomenat E2 consisteix en 120,8 (±0,1) g de sòl nadiu humit (equivalents a 90,0 g de sòl sec) i 10,0 (±0,1) g de sòl estèril sec enriquit amb una mescla de set PAHs obtenint, doncs, una concentració final de 300 mg·kg⁻¹. Finalment, a cadascun d'ells s'hi introdueixen 5,40 (±0,01) mL d'aigua per arribar al 70 % de la MWHC i s'homogeneïtza novament. Els microcosmos es conserven fins al moment de la seva anàlisi a temperatura ambient controlada (20 °C), protegits de la llum solar i s'airegen periòdicament perquè no hi hagi manca d'oxigen. Es preparen un total de 6 microcosmos: tres replicats per cadascun dels microcosmos (E1 i E2), esquematitzat a la Figura 20.

Per saber la quantitat que cal afegir de sòl nadiu humit equivalent a 90 g de sòl sec:

$$\text{g sòl humit a introduir per 100,0 g de microcosmos} = \frac{9000 \text{ g}}{100 - \% \text{ humitat}}$$

Per conèixer la quantitat d'aigua que cal afegir al microcosmos per arribar al 70 % de la MWHC,:

$$\text{g totals microcosmos} = \frac{10000 \text{ g}}{100 - 70 \% \text{ MWHC}}$$

$$\text{g H}_2\text{O afegir} = \text{g totals microcosmos} - (\text{g sòl humit} + 10,0 \text{ g sòl estèril sec})$$

***Exemple: Un sòl amb un 25,5 % d'humitat, MWHC de 38 %**

Els grams de sòl humit a introduir equivalents a 90,0 g de sòl sec són 120,8 g

Els grams totals del microcosmos per tenir el 70 % de la MWHC, és a dir, 26,6 %, són 136,2 g

$$\text{A cada pot caldrà afegir } 136,2 \text{ g} - (120,8 + 10,0) \text{ g} = 5,4 \text{ g d'aigua}$$

El microcosmos està format per 10,0 g de sòl sec, 120,8 g de sòl humit i 5,4 mL d'aigua, assumint la densitat de l'aigua d'1,000 g·mL⁻¹

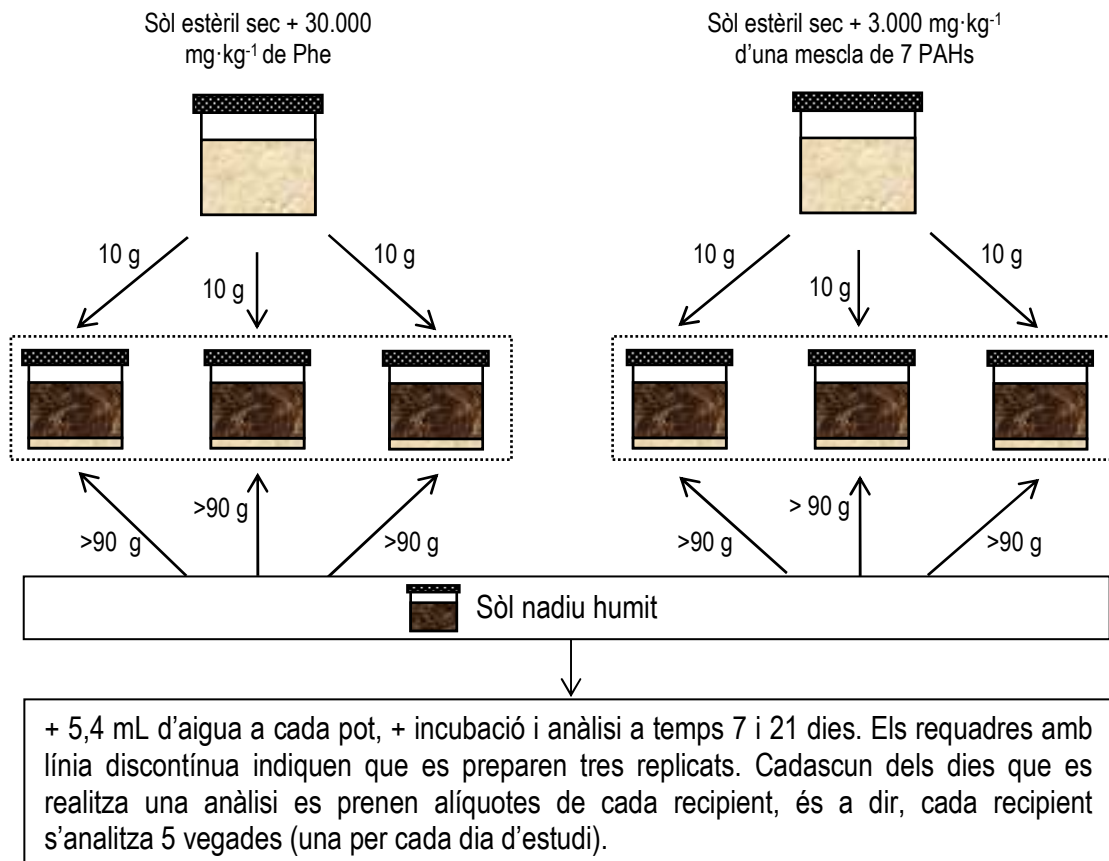


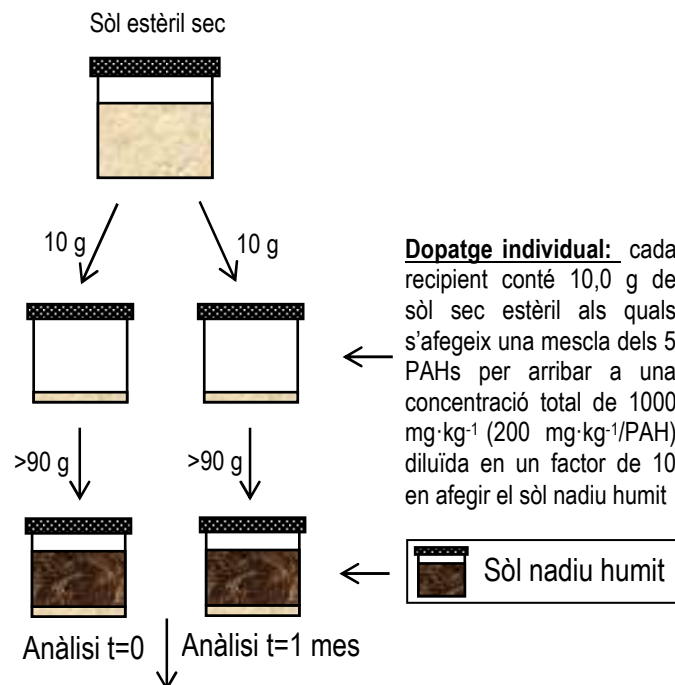
Figura 20. Esquema de la preparació dels microcosmos E1 i E2

2.10.2. MICROCOSMOS PREPARATS A PARTIR DEL SÒL DE SANT QUIRZE, POLINYÀ I SABADELL

El primer pas abans de dur a terme els estudis de degradació dels PAHs en presència de diferents concentracions de metalls consisteix en la selecció del sòl de treball (apartat de resultats i discussió, secció 3.4.2). Un dels paràmetres que es tenen compte per a la selecció del sòl de treball és la capacitat de degradació del mateix, motiu pel qual es preparen diferents microcosmos dopats amb PAHs a partir de les mostres de Sant Quirze, Polinyà i Sabadell, per tal de valorar, quina és la degradació que ha tingut lloc al cap d'un mes.

Per la preparació dels microcosmos, una part de cadascun dels sòls s'esterilitza, s'asseca a 35 °C durant 24 h i es moltura. En diferents recipients de vidre s'introdueixen 10,0 g de sòl sec i s'hi afegeix una mescla de 5 PAHs (Phe, Fluo, Pyr, BbF i BaP) dissolts en acetona fins a arribar a una concentració total de 1.000 mg·kg⁻¹ (200 mg·kg⁻¹/PAH). A continuació, s'homogeneïtzen els sòls dopats durant 48 h per distribuir els PAHs per tota la matriu i per evaporar l'acetona.

Després d'una setmana d'estabilització, a cada recipient que conté 10,0 ($\pm 0,1$) g del sòl dopat s'hi afegeixen més de 90,0 ($\pm 0,1$) g de sòl nadiu humit (equivalent a 90 g de sòl sec en funció de la humitat de cada sòl) i s'homogeneïtzen per a l'obtenció dels microcosmos. Així doncs, la concentració final de PAHs obtinguda als microcosmos és de 100 mg·kg⁻¹ (20 mg·kg⁻¹/PAH). Finalment, a cadascun dels microcosmos s'introdueix un volum d'aigua concret per arribar al 60 % de la MWHC i s'homogeneïtza novament. Els microcosmos es conserven fins al moment de la seva anàlisi a temperatura ambient controlada (20 °C), protegits de la llum solar i s'airegen periòdicament perquè no hi hagi manca d'oxigen. Es preparen un total de sis microcosmos: un per cadascun dels tres sòls, pels temps d'anàlisi inicial i al cap d'1 mes^{††}, procediment esquematitzat a la Figura 21.



+ X mL d'aigua a cada pot, + incubació i anàlisi a temps inicial i al cap d'1 mes. Un s'utilitza per l'anàlisi a temps inicial (0 dies), mentre que l'altre s'utilitza per l'anàlisi a temps 30 dies, és a dir, un mateix recipient és analitzat tan sols una vegada.

Figura 21. Esquema de la preparació dels microcosmos a partir dels sòls de Sant Quirze, Polinyà i Sabadell

^{††} La preparació dels microcosmos en la secció 2.10.1 és diferent que a la secció 2.10.2. A la secció 2.10.1 primer es dopa una gran quantitat de sòl estèril sec, s'homogeneïtza i, a partir d'aquest, es preparen cadascun dels microcosmos, agafant 10,0 g del sòl estèril sec dopat mesclant-lo amb més de 90,0 g de sòl nadiu humit. En canvi, a la secció 2.10.2 primer es col·loquen 10,0 g de sòl estèril sec a cada recipient de vidre, es dopa cadascun d'ells de forma individual i, finalment, s'afegeixen els més de 90,0 g de sòl nadiu humit, tot homogeneïtzant.

2.10.3. MICROCOSMOS PREPARATS A PARTIR DEL SÒL DE SABADELL

Per l'estudi de la influència dels HM en la degradació dels PAHs (apartat de resultats i discussió, secció 3.4) es preparen una sèrie de microcosmos dopant el sòl amb una quantitat fixa de PAHs i diferents concentracions de HM.

Els microcosmos es preparen de la mateixa manera que anteriorment (secció 2.10.2), aprofitant l'addició d'aigua per introduir els diferents nivells de HM dissolts en aquesta a partir de les seves sals nitrades. Per tant, segons les característiques del sòl de Sabadell, els microcosmos es preparen mitjançant 91,7 ($\pm 0,1$) g de sòl nadiu humit (equivalents a 90,0 g de sòl sec) i 10,0 ($\pm 0,1$) g de sòl estèril sec enriquit amb la mescla dels 5 PAHs (Phe, Fluo, Pyr, BbF i BaP). Així doncs, la mescla final contindrà una concentració total de 100 mg·kg⁻¹ (20 mg·kg⁻¹/PAH). A continuació, a cadascun dels microcosmos s'hi introdueixen 22,1 ($\pm 0,1$) mL d'aigua per arribar al 60 % de la MWHC, la qual conté dissolts diferents nivells de metalls seleccionats. Per últim, es conserven fins al moment de la seva anàlisi a temperatura ambient controlada (20 °C), protegits de la llum solar i s'airegen periòdicament perquè no hi hagi manca d'oxigen. El blanc es prepara de la mateixa manera que els demés microcosmos però es troba constituït de 100,0 ($\pm 0,1$) g de sòl estèril sec, per tal d'evitar la degradació dels PAHs. Es preparen un total de 44 microcosmos: un blanc, quatre grups de diferents nivells de metalls, vuit dies d'anàlisi (0, 3, 7, 10, 15, 21, 30 i 60 dies) i quatre duplicats d'un dels nivells de metalls en dies aleatoris.

2.11. BIBLIOGRAFIA

- [1] United States Environmental Protection Agency (US EPA), Method 3540C, <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf> [En línia], Maig 2010.
- [2] United States Environmental Protection Agency (US EPA), Method 3546, <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3546.pdf> [En línia], Maig 2011.
- [3] P. Oleszczuk, S. Baran, J. Hazard. Mater., 113 (2004) 237.
- [4] N. Ratola, S. Lacrote, A. Alves, D. Barceló, J. Chromatogr. A, 1114 (2006) 198.
- [5] United States Environmental Protection Agency (US EPA), Method 3630C, <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3630c.pdf> [En línia], Maig 2010.
- [6] S. Elordui-Zapatarietxe, A. Rosell-Melé, N. Moraleda, I. Tolosa, J. Albaigés, Mar. Pollut. Bull., 60 (2010) 1667.
- [7] European Medicines Agency, ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, <http://www.ich.org/products/guidelines/quality/quality-single/article/validation-of-analytical-procedures-text-and-methodology.html> [En línia], Gener 2010.
- [8] United States Environmental Protection Agency (US EPA), Method 8270C, <http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/8270c.pdf> [En línia], Maig 2010.
- [9] G. Pérez, Disponibilidad de metales tóxicos en sitios contaminados, Tesi Doctoral (2005), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Espanya.
- [10] W. L. Pritchett, R. F. Fisher, Properties and Management of Forest Soils, Ed. John Wiley & Sons (1987), Nova York, Estats Units.
- [11] E. Zagal, R. Sadzawka, Protocolo de métodos de análisis para suelos y lodos, <http://www.sag.cl/buscar/protocolo%20de%20m%C3%A9todos%20de%20an%C3%A1lisis%20para%20suelos%20y%20lodos> [En línia], Marzo 2011.
- [12] Y. Martinez, C. Rivero, Rev. Ingeniería UV, 12 (2005) 14.
- [13] Y. Fujikawa, M. Fukui, A. Kudo, Water Air Soil Poll., 124 (2000) 1.
- [14] N. L. Dollar, C. J. Souch, G. M. Filippelli, M. Mastalerz, Environ. Sci. Technol. 35 (2001) 3608.

CAPÍTOL TERCER
RESULTATS I DISCUSSIÓ

| | |
|--|------------|
| 3. RESULTATS I DISCUSSIÓ | 153 |
| 3.1. ANÀLISI D'HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS (PAHs) | 153 |
| 3.1.1. TÈCNICA INSTRUMENTAL D'ANÀLISI: CROMATOGRAFIA DE GASOS ACOBLADA A L'ESPECTROMETRIA DE MASSES (GC/MS) | 154 |
| 3.1.2. MÈTODES ANALÍTICS DE PURIFICACIÓ..... | 157 |
| 3.1.2.1. SPE C18 | 157 |
| 3.1.2.2. COLUMNA AMB GEL DE SÍLICE..... | 160 |
| 3.1.2.3. SPE AMB SÍLICE COMPACTADA..... | 161 |
| 3.1.2.4. COLUMNA MIXTA AMB GEL DE SÍLICE I ALÚMINA | 162 |
| 3.1.3. MÈTODES ANALÍTICS D'EXTRACCIÓ..... | 165 |
| 3.1.3.1. EXTRACCIÓ SOXHLET | 165 |
| 3.1.3.2. EXTRACCIÓ ASSISTIDA PER MICROONES | 166 |
| 3.1.4. EFECTE DEL PRETRACTAMENT DE MOSTRA: TAMISAT I MÒLTA | 169 |
| 3.2. ANÀLISI D'HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS MONOHIDROXILATS (OH-PAHs) | 172 |
| 3.2.1. ANÀLISI DELS OH-PAHs | 173 |
| 3.2.1.1. SILILACIÓ-GC/MS..... | 173 |
| 3.2.1.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ AMB DETECTOR DE FLUORESCÈNCIA (HPLC/FLD) | 175 |
| 3.2.2. PURIFICACIÓ MITJANÇANT POLÍMERS IMPREMTATS MOLECULARMENT (MIPs): ELECCIÓ DEL VOLUM I SOLVENTS D'ELUCIÓ ÒPTIMS..... | 177 |
| 3.2.3. EXTRACCIÓ ASSISTIDA PER MICROONES: ELECCIÓ DELS SOLVENTS I TEMPERATURA ÒPTIMS | 179 |
| 3.2.4. COMPARACIÓ DE LA NOVA METODOLOGIA DESENVOLUPADA MAE- MIPs-HPLC/FLD AMB MAE-SILILACIÓ-GC/MS..... | 183 |
| 3.2.5. APLICACIÓ A ESTUDIS DE BIODEGRADACIÓ | 186 |
| 3.2.5.1. 9-HIDROXIFENANTRÈ AL MICROCOSMOS E1 | 186 |
| 3.2.5.2. METABÒLITS HIDROXILATS AL MICROCOSMOS E2..... | 188 |
| 3.3. CARACTERITZACIÓ DE LES MOSTRES | 190 |
| 3.4. INFLUÈNCIA DELS METALLS PESANTS (HM) EN LA DEGRADACIÓ DELS HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS (PAHs) | 193 |
| 3.4.1. SELECCIÓ DEL NIVELL DE DOPATGE DELS PAHs..... | 195 |

| | | |
|-------------|--|------------|
| 3.4.2. | SELECCIÓ DEL SÒL DE TREBALL | 195 |
| 3.4.3. | SELECCIÓ DEL NIVELL DE DOPATGE DELS HM | 197 |
| 3.4.3.1. | ESTUDI MICROBIOLÒGIC A DIFERENTS CONCENTRACIONS DE METALLS PESANTS | 198 |
| 3.4.4. | DEGRADACIÓ DELS PAHs EN PRESENCIA DE DIFERENTS CONCENTRACIONS DE HM ALS MICROCOSMOS | 203 |
| 3.4.5. | DETERMINACIÓ DE METABÒLITS HIDROXILATS COM A PRODUCTE DE DEGRADACIÓ DEL PAHs ALS MICROCOSMOS | 211 |
| 3.5. | RESUM DE RESULTATS..... | 215 |
| 3.6. | BIBLIOGRAFIA..... | 220 |

3.RESULTATS I DISCUSSIÓ

3.1. ANÀLISI D'HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS (PAHs)

En aquest estudi es presenten els resultats associats a la posta a punt d'una metodologia d'anàlisi de PAHs (extracció, purificació i anàlisi instrumental), adequada als laboratoris del Centre Grup de Tècniques de Separació en Química (GTS). Es prenen com a referència alguns mètodes prèviament desenvolupats per la US EPA i descrits a l'apartat experimental, algun d'ells amb certes modificacions ja que sovint, la seva reproducció exacte no és trivial ni òbvia. Els mètodes d'extracció aplicats són l'extracció Soxhlet (US EPA 3540C: *Soxhlet extraction*) i l'extracció assistida per microones (US EPA 3546: *Microwave extraction*), aquest últim amb certes modificacions per millorar l'eficiència d'extracció i descrits a l'apartat experimental, seccions 2.4. Els diferents mètodes de purificació utilitzats són l'extracció en fase sòlida (SPE) amb fase C18, SPE amb sílice compactada, la cromatografia amb columna amb gel de sílice (US EPA 3630C: *Silica Gel Cleanup*) i la cromatografia en columna mixta amb gel de sílice i alumina, descrites a l'apartat experimental, secció 2.5. L'anàlisi instrumental final es porta a terme mitjançant la cromatografia de gasos acoblada a l'espectrometria de masses (GC/MS), amb certes modificacions respecte el mètode original (US EPA 8270C: *Semivolatile organic compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)*), descrit a l'apartat experimental, secció 2.6.4.1.

L'esquema de les diferents etapes del procediment dut a terme per l'anàlisi de mostres de sòls contaminats es mostra a la Figura 1. Cal remarcar que, a l'hora de posar a punt el procediment analític per a la determinació dels PAHs, és necessari començar per l'optimització de la darrera etapa, tot seguint l'ordre invers: anàlisi instrumental, purificació i, finalment, extracció.

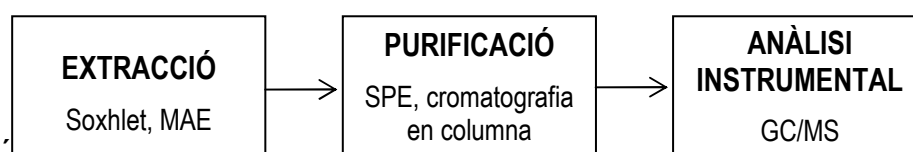


Figura 1. Esquema de les diferents etapes del procediment analític per l'anàlisi dels PAHs en mostres de sòls

3.1.1. TÈCNICA INSTRUMENTAL D'ANÀLISI: CROMATOGRÀFIA DE GASOS ACOBLADA A L'ESPECTROMETRIA DE MASSES (GC/MS)

Seguint el mètode optimitzat descrit a l'apartat experimental per a l'anàlisi instrumental dels 16 PAHs (secció 2.6.4), s'analitzen una sèrie de patrons de PAHs en mode *Full Scan* (50-300 uma) i es procedeix a la identificació i assignació de cadascun dels pics amb el PAH corresponent, mitjançant el seu espectre de masses i utilitzant la llibreria comercial del *National Institute of Standards and Technology* (NIST). A la Figura 2 es mostra el cromatograma corresponent a la separació dels 16 PAHs (assignats a cadascun dels pics) d'una dissolució patró d'1,000 mg·L⁻¹. Es pot veure que la separació dels 16 PAHs s'aconsegueix en un total de 38 min (26 min des de l'aparició del primer PAH, Naph, fins a l'elució del darrer, B(g,h,i)P).

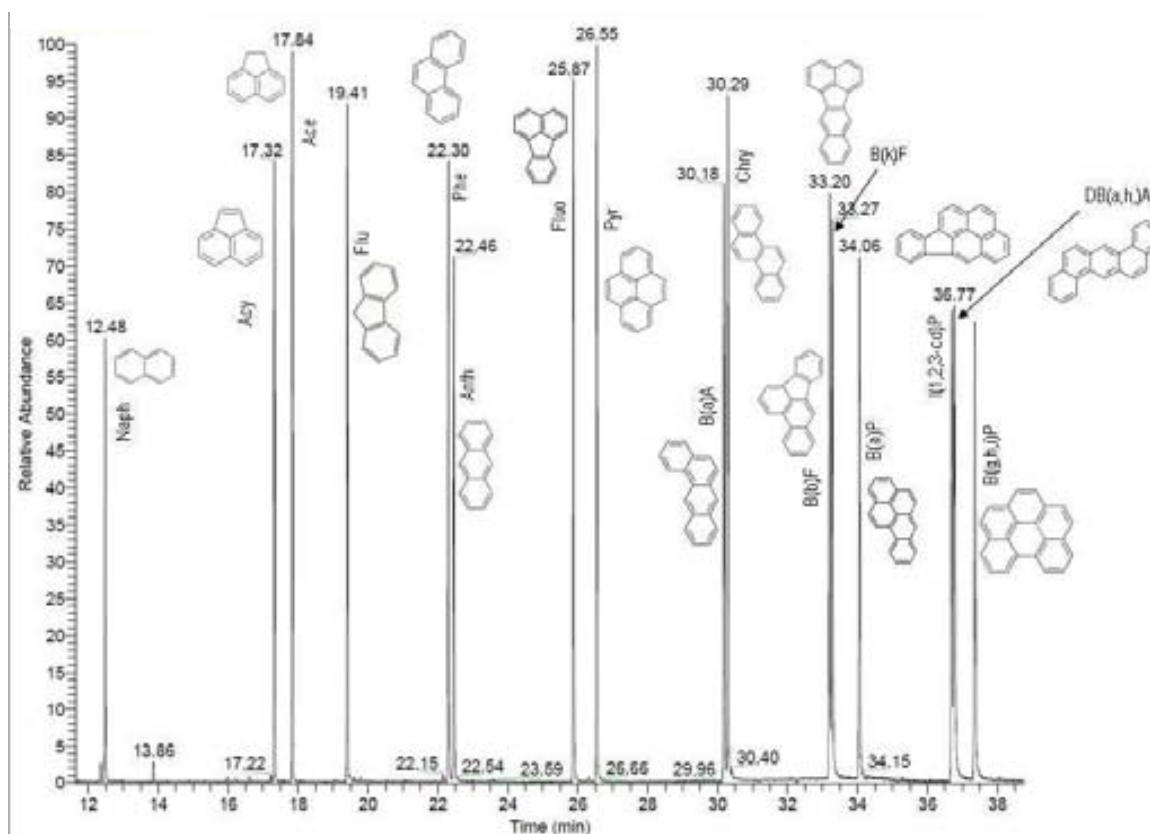


Figura 2. Cromatograma corresponent a la separació d'una solució patró d'1,000 mg·L⁻¹ dels 16 PAHs mitjançant GC/MS, en mode *Full Scan*, segons el mètode descrit a l'apartat 2.6.4.

Per altra banda, a la Figura 3 es mostra un exemple de l'elucidació dels diferents fragments com a resultat de la ionització per impacte electrònic de la mescla patró, pel cas particular de l'Anth. Es pot observar el pic molecular de l'Anth (178 m/z), és a dir, l'ió obtingut per la pèrdua d'un

electró de la molècula ($C_{14}H_{10}^+$) que, en aquest cas, també és el pic base, és a dir, el de major abundància (intensitat del 100 %). Si s'amplia la zona entre 170-178 m/z es pot veure un pic a 179 m/z, corresponent a la presència de l'isòtop del carboni ($C_{13}^{13}CH_{10}^+$) i també els diferents pics de fragmentació obtinguts com a resultat de la successiva descomposició de l'ió molecular a través de la pèrdua de H^+ ($C_{14}H_9^+$, $C_{14}H_8^+$, $C_{14}H_7^+$, etc.). Per altra banda, a la zona entre 140-160 m/z s'observa la pèrdua d'un fragment de major mida, corresponent a l'eliminació d'acetilè (demostrat en estudis de fotoionització) [1], que condueix a la formació del carbocatió $C_{12}H_8^+$, i també la formació d'altres carbocations menys abundants a zones <140 m/z, com el $C_{10}H_n^+$, $C_9H_{10}^+$, $C_8H_{10}^+$, etc. Per últim, també es pot observar la formació d'ions amb càrrega múltiple com ara el $C_{14}H_{10}^{2+}$. Un cop assignats els diferents pics a cadascun dels PAHs, se seleccionen els ions principals i els ions secundaris més representatius per a dur a terme l'anàlisi en mode *Selected Ion Monitoring* (SIM).

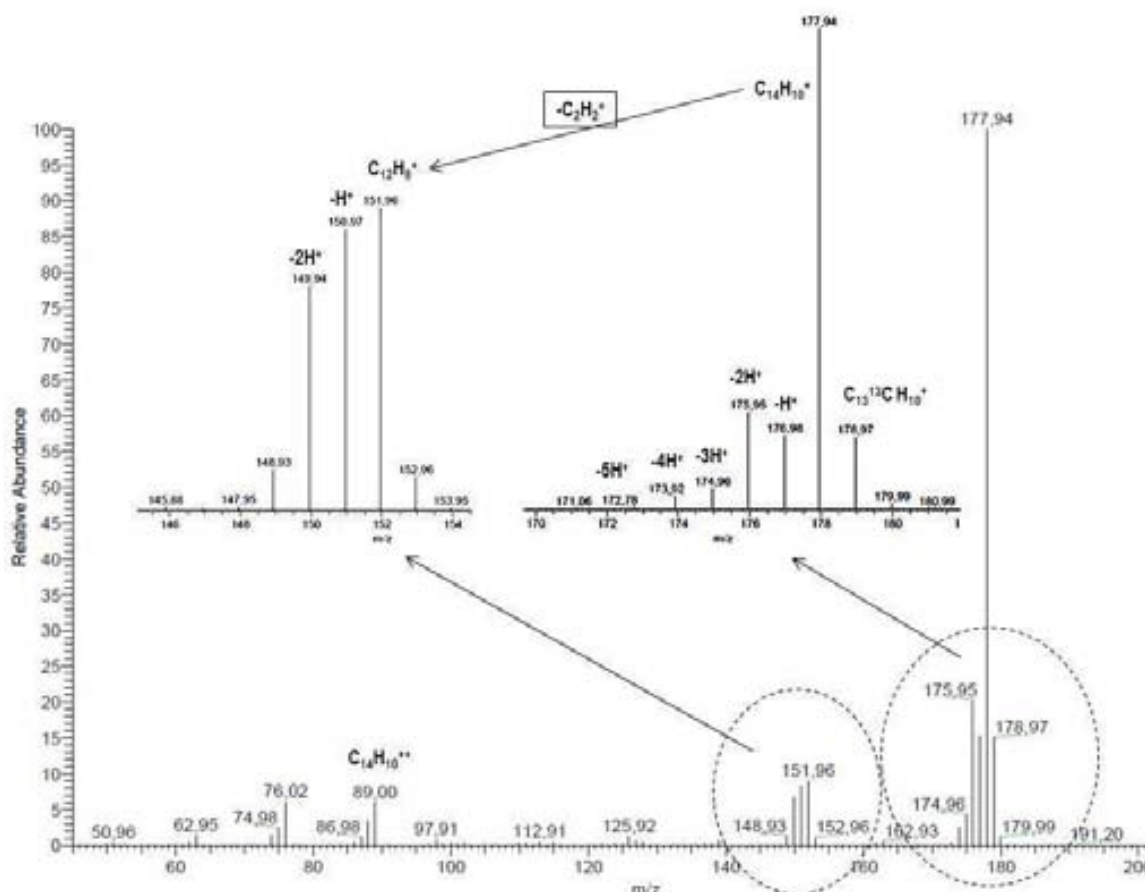


Figura 3. Espectre de masses de l'Anth obtingut per impacte electrònic (EI) a 70 eV, en mode *Full Scan*.

A continuació, es prepara el calibratge entre 5 i 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, amb la utilització de Phe-D₁₀ com a patró intern, afegit a una concentració de 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Per comprovar la linealitat de la regressió es realitza una anàlisi de variància (ANOVA), un exemple de la qual es pot veure a l'Annex 3. A

la Taula 1 mostren els paràmetres de la regressió lineal, així com els límits de detecció (DL) i quantificació (QL) de la tècnica instrumental. La determinació dels límits de detecció (DL) i quantificació (QL) es realitza basant-se en la relació senyal/soroll. Es comparen els senyals mesurats de patrons a baixes concentracions dels analits (0,100 a 1,000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) amb el senyal del blanc i establint la mínima concentració a la qual l'analit pot ser detectat amb fiabilitat. Una relació senyal/soroll de 3 vegades es considera acceptable per l'estimació del DL, i de 10 per l'estimació del QL.

Taula 1. Paràmetres de regressió del calibratge dels 16 PAHs mitjançant GC/MS

| PAHs | Temps de retenció (min) | Rang estudiat ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | $y=ax+b$ | | r^2 | DL ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | QL ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) |
|---------------|-------------------------|---|-------------------|-------------------|-------|--|--|
| | | | $a \pm \text{SD}$ | $b \pm \text{SD}$ | | | |
| Naph | 12,48 | 5-1000 | $29,4 \pm 0,4$ | $-0,1 \pm 0,1$ | 0,997 | 0,26 | 0,86 |
| Acy | 17,32 | 5-1000 | $53,9 \pm 0,5$ | $-0,5 \pm 0,2$ | 0,998 | 0,20 | 0,65 |
| Ace | 17,64 | 5-1000 | $68,8 \pm 0,8$ | $-0,2 \pm 0,4$ | 0,997 | 0,26 | 0,86 |
| Flu | 19,41 | 5-1000 | $70,5 \pm 0,9$ | $-0,9 \pm 0,4$ | 0,996 | 0,33 | 1,08 |
| Phe | 22,30 | 5-1000 | $50,0 \pm 0,6$ | $-0,7 \pm 0,3$ | 0,997 | 0,13 | 0,43 |
| Anth | 22,46 | 5-1000 | $49,1 \pm 0,8$ | $-1,0 \pm 0,3$ | 0,995 | 1,70 | 5,61 |
| Fluo | 25,87 | 5-1000 | $59,1 \pm 0,7$ | $-0,9 \pm 0,3$ | 0,997 | 0,27 | 0,88 |
| Pyr | 26,55 | 5-1000 | $68,6 \pm 0,8$ | $-1,0 \pm 0,3$ | 0,997 | 0,26 | 0,86 |
| BaA | 30,18 | 5-1000 | $29,4 \pm 0,4$ | $-0,1 \pm 0,2$ | 0,997 | 0,68 | 2,23 |
| Chry | 30,29 | 5-1000 | $93,0 \pm 0,9$ | $-0,7 \pm 0,7$ | 0,994 | 0,91 | 3,00 |
| BbF | 33,20 | 5-1000 | $33,9 \pm 0,6$ | $-0,6 \pm 0,2$ | 0,994 | 2,48 | 8,18 |
| BkF | 33,27 | 5-1000 | $51,0 \pm 0,9$ | $-1,4 \pm 0,4$ | 0,994 | 3,50 | 11,57 |
| BaP | 34,06 | 5-1000 | $36,1 \pm 0,6$ | $-0,6 \pm 0,1$ | 0,996 | 4,72 | 15,58 |
| I(1,2,3-c,d)P | 36,77 | 5-1000 | $25,2 \pm 0,5$ | $-0,6 \pm 0,1$ | 0,994 | 4,98 | 16,42 |
| DB(a,h)A | 36,87 | 5-1000 | $43,0 \pm 0,8$ | $-0,7 \pm 0,2$ | 0,994 | 4,07 | 13,32 |
| B(g,h,i)P | 37,40 | 5-1000 | $46,7 \pm 0,8$ | $-0,9 \pm 0,2$ | 0,995 | 2,09 | 6,87 |

Un cop posat a punt el mètode instrumental de determinació dels PAHs, se'n seleccionen 6 d'ells, com a models de contaminants, basats en els següents criteris:

- ✓ Representativitat estructural: en funció del nombre total d'anells (aromàtics i anells saturats)

- ✓ Toxicitat: els considerats més tòxics
- ✓ Percentatge d'abundància en mostres de sòls estudiats en bibliografia existent [2]
- ✓ Límits d'emissió permesos pel Real Decreto 9/2005 [3]
- ✓ Preu dels patrons sòlids de cadascun dels PAHs

Així doncs, els PAHs finalment seleccionats són el Fenantrè (Phe), Fluorantè (Fluo), Pirè (Pyr), Benzo(a)Antracè (BaA), Crisè (Chry) i Benzo(b)Fluorantè (BbF). A continuació, es procedeix a l'avaluació de les diferents etapes de purificació mitjançant patrons purs dels 6 PAHs escollits.

3.1.2. MÈTODES ANALÍTICS DE PURIFICACIÓ

3.1.2.1. SPE C18

Per dur a terme l'avaluació de l'etapa de purificació s'utilitza una mescla patró, dins el rang de calibratge, de cadascun dels PAH seleccionats anteriorment (Phe, Fluo, Pyr, BaA, Chry i BbF). Es procedeix a l'adaptació de dos mètodes de purificació pels PAHs (V1 i V2), seguint les indicacions descrites a l'apartat experimental (secció 2.5.1.1), els quals es diferencien en l'etapa de condicionament previ del cartutx. Al mètode V1 es realitza una etapa de rentat del cartutx un cop introduïda la mostra, absent al V2. A part de la fracció corresponent a l'elució dels PAHs, també es recullen i s'analitzen les fraccions corresponents a les etapes de càrrega i rentat, per avaluar les possibles pèrdues durant aquestes etapes del procediment de purificació.

A la Figura 4 es mostra el percentatge de recuperació dels diferents PAHs per cadascuna de les etapes del procediment de purificació del mètode V1 (fraccions de càrrega, rentat, elució amb hexà:diclorometà i elució amb hexà). Per una banda, es pot observar que la major part dels PAHs es perden durant l'etapa de càrrega (77-85 %), és a dir, no interaccionen favorablement amb la fase sòlida C18 del cartutx de SPE. Aquest és un factor negatiu, ja que interessa que hi quedin retinguts i així, en el següent pas de rentat es puguin eliminar gran part de les interferències presents. Per altra banda, els PAHs que queden retinguts són eluïts quasi de manera completa a l'etapa d'hexà:diclorometà, la qual cosa és d'esperar (15-23 %). També s'observa que l'etapa de rentat no afecta als PAHs, ja que la poca quantitat de cadascun d'ells que queda retinguda després de la fase de càrrega no elueix en aquesta fracció (només es pot arribar a quantificar aproximadament un 1 % de Fluo). El mateix passa en la darrera etapa amb hexà, la qual no és necessària segons el mètode seguit i que és introduïda per tal d'assegurar l'elució dels PAHs de

major pes molecular en cas que mescla hexà:diclormetà no tingui prou força eluotrópica per fer-ho.

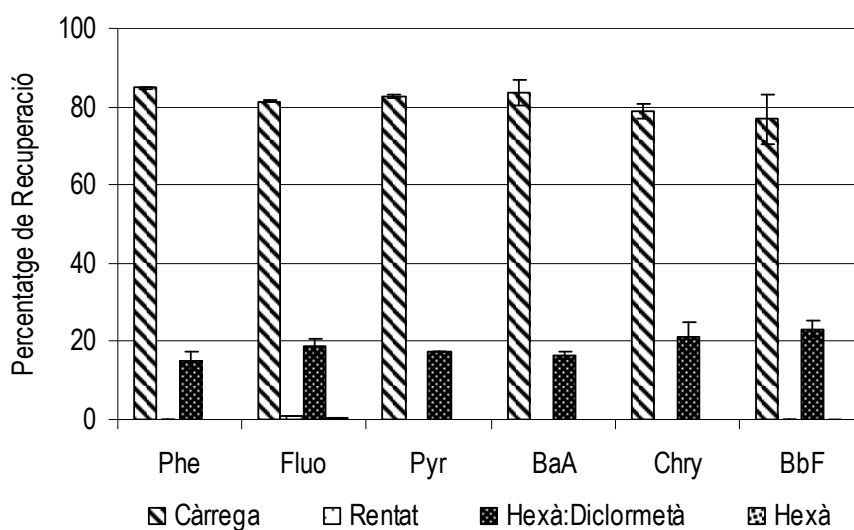


Figura 4. Pèrdua dels PAHs durant les fases de càrrega de la mostra i recuperació a la fase d'elució amb hexà:diclormetà mitjançant SPE C18 del mètode V1. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació (n=3)

Els resultats respecte el mètode V2 es mostren a la Figura 5. Es pot observar que el comportament del sistema és molt similar al del mètode V1. En l'etapa de càrrega es perd entre el 84-89 % i la poca part dels PAHs que queda retinguda acaba eluint a l'etapa amb hexà:diclormetà (11-16 %).

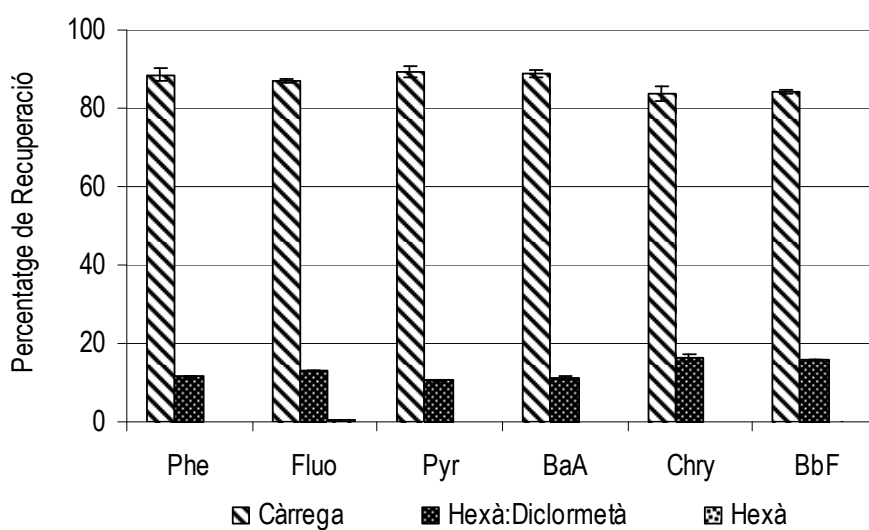


Figura 5. Pèrdua dels PAHs durant les fases de càrrega de la mostra i recuperació a la fase d'elució amb hexà:diclormetà mitjançant SPE C18 del mètode V2. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació (n=3)

Així doncs, el mètode de purificació proposat mitjançant SPE C18 no és adequat per a la purificació dels PAHs. Un dels motius de la pèrdua dels analits que s'observa a la fase de càrrega pot ser conseqüència d'utilitzar cartutxos de només 0,5 g, juntament amb l'aplicació de buit mitjançant l'aparell *Vacuum Manifold*. Aquest fet es tradueix en un augment de la velocitat d'elució de cadascuna de les fases, cosa que pot provocar que no es doni una interacció eficient entre la mostra i la fase C18 per la manca de temps de contacte. Per això, es repeteix l'experiència pel cas del mètode V2 però, en aquesta ocasió, l'elució es porta a terme per la força de la gravetat. Aquest procediment només es porta a terme seguint mètode V2 ja que és més curt a causa de l'absència de l'etapa de rentat. Els resultats es mostren a la Figura 6, on s'observa que sense l'aplicació de buit es produeixen menys pèrdues durant l'etapa de càrrega de la mostra (65-71 %) i millors recuperacions a l'etapa d'elució amb hexà:diclorometà (30-36 %) en comparació amb el mètode V2 anteriorment descrit (amb l'aplicació de buit).

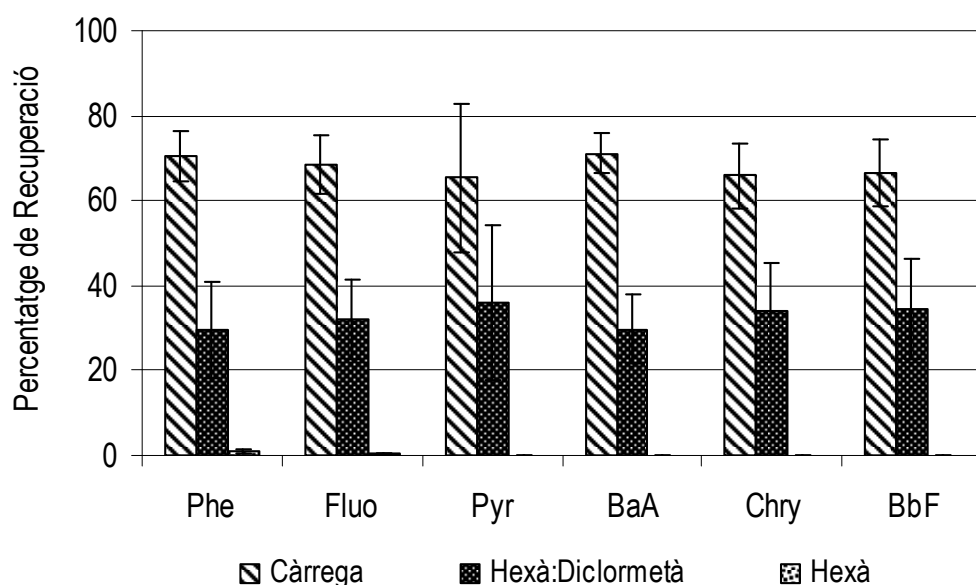


Figura 6. Pèrdua dels PAHs durant les fases de càrrega de la mostra i recuperació en la fase d'elució amb hexà:diclorometà mitjançant SPE C18 del mètode V2, sense l'aplicació de buit. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació (n=3)

Això és indicatiu de que l'aplicació de buit provoca una velocitat d'elució major i que amb cartutxos amb quantitats de fase sòlida petites, desafavoreix la interacció eficient entre els analits que cal purificar i la fase C18. Tanmateix, la RSD d'aquesta experiència és molt més elevada (7-51 %), probablement perquè l'elució per gravetat no es troba dirigida de manera controlada com succeeix mitjançant l'aplicació de buit i, en funció de la saturació del cartutx, es pot veure modificada a mesura que avança l'experiment. A més, el procés dut a terme per gravetat és molt

lent (35 min sense comptar l'etapa d'asseccament del cartutx), en contrapartida amb l'aplicació de buit (3 min, sense comptar l'etapa d'asseccament del cartutx). De totes maneres, la quantitat perduda durant l'etapa de càrrega és molt elevada per acceptar aquest mètode com a adequat per la purificació dels PAHs ja que, en molts casos, és crític recuperar la màxima quantitat possible dels analits, sobretot per a la quantificació a nivell traça [4] d'aquests tipus de compostos en mostres de sòls poc contaminats.

De fet, els resultats obtinguts són contraris als reportats pel mètode al qual s'ha fet referència, en què Oleszczuk *et al.* (2004) obtenien una recuperació pels diferents PAHs entre el 72-106 % en l'etapa d'elució [5]. Per altra banda, altres autors com Oluseyi *et al.* (2011) van provar diferents solvents en la purificació mitjançant SPE C18 aplicada a l'anàlisi de PAHs en sòls i van observar que amb THF:diclorometà (1:1) s'arribava a recuperar-ne el 85-108% [6]. Kabzinski *et al.* (2002) també havien determinat percentatges de recuperació entre el 64-104 % després d'una etapa d'elució amb acetonitril:diclorometà (1:1) mitjançant un mètode similar aplicat a la purificació d'aigües de consum [7] i Habibi *et al.* (2008) ho van fer amb aigües del Mar Caspi arribant a recuperacions superiors al 100 % en utilitzar hexà en l'elució [8]. Andrade-Eiroa *et al.* (2010) van aplicar la purificació SPE C18 a mostres de sutge de querosè i bioquerosè amb recuperacions entre el 89-96 %. [9]

Així doncs, sembla que el procés de càrrega de l'extracte al cartutx no s'ha aconseguit portar a terme satisfactòriament, la qual cosa dificulta la continuïtat del mètode de purificació per obtenir resultats quantitius acceptables.

3.1.2.2. COLUMNA AMB GEL DE SÍLICE

Descartats els cartutxos SPE C18, es decideix estudiar l'ús d'una fase més polar com és el gel de sílice, mitjançant l'ús de la cromatografia en columna com a mètode de purificació. En aquest cas, el procediment seguit inclou les etapes de càrrega, rentat i elució, descrites a l'apartat experimental (secció 2.5.2.1).

El percentatge de pèrdua o recuperació associats als diferents compostos en cadascuna de les etapes del purificació es presenten a la Figura 7. Es pot veure clarament que durant l'etapa de càrrega de mostra a la columna no es perden pràcticament els PAHs, sent el màxim un 4 % de

Phe i un 3 % de Fluo. Tampoc s'observen pèrdues durant l'etapa de rentat amb pentà, en què es perd menys de l'1 % de Phe i Fluo. Així doncs, els PAHs queden adsorbits al gel de sílice i és durant l'etapa d'elució amb diclormetà:pentà quan elueixen els analits, tal com és d'esperar, i amb recuperacions entre el 96-100 %. La RSD en l'etapa d'elució dels analits, que és on es recupera la majoria dels PAHs, és inferior al 15 % en tots els casos, la qual cosa demostra una reproductibilitat acceptable en la preparació de les diferents cromatografies en columna.

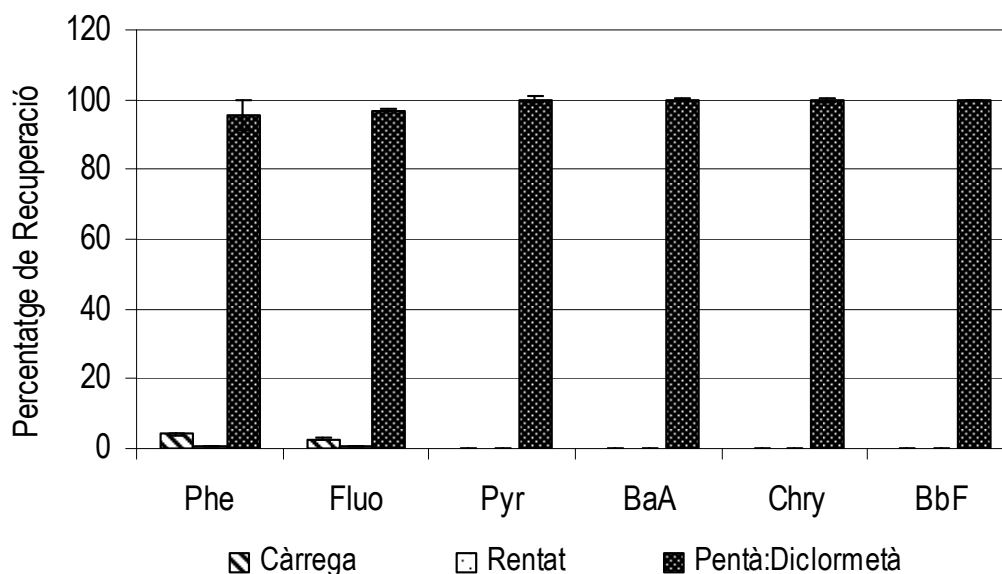


Figura 7. Percentatge de recuperació dels PAHs mitjançant la purificació per cromatografia en columna amb gel de sílice com a adsorbent. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació del procediment de purificació (n=3)

3.1.2.3. SPE AMB SÍLICE COMPACTADA

Vista l'efectivitat del mètode de purificació mitjançant gel de sílice com a adsorbent en columna, es decideix provar la utilització dels cartutxos de SPE amb sílice compactada per reduir el temps de preparació de la columna, ja que és un procediment més elaborat que la SPE. A partir d'aquí, només s'avalua l'etapa d'elució ja que s'ha comprovat anteriorment (secció 3.1.2.2) que la utilització del gel de sílice no comporta una pèrdua significativa en les etapes de càrrega i rentat durant la purificació dels PAHs.

A la Figura 8 es mostren els percentatges de recuperació dels 6 PAHs després de la purificació mitjançant SPE amb sílice compactada dut a terme segons el procediment descrit a l'apartat experimental (secció 2.5.1.2). A la figura es pot observar que la recuperació dels PAHs és molt

alta, entre el 92-109 % i la RSD és inferior al 10 % en tots els casos. Per aquest motiu, aquest mètode de purificació es considera acceptable per a la purificació dels PAHs.

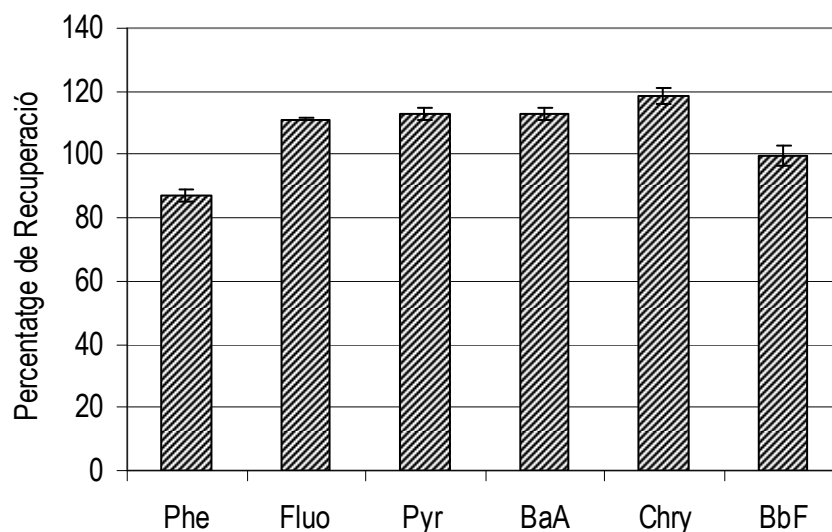


Figura 8. Percentatge de recuperació del mètode de purificació mitjançant SPE amb sílice compactada. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació (n=3)

3.1.2.4. COLUMNA MIXTA AMB GEL DE SÍLICE I ALÚMINA

Aquest mètode de purificació s'aplica com a alternativa a la SPE amb sílice compactada pels casos en què a les mostres hi pot haver, a més dels PAHs, alts nivells de contaminació amb hidrocarburs alifàtics (procedents d'olis, carbons, etc.). Aquest mètode permet el fraccionament d'aquests grups de contaminants cosa que permet realitzar l'anàlisi instrumental PAHs sense interferència significatives dels altres contaminants mencionats. Tal i com s'explica a l'apartat experimental (secció 2.5.2.2), els compostos alifàtics elueixen a la primera fracció amb hexà i els aromàtics ho fan a la fracció amb hexà:diclometà.

A la Figura 9 es mostren els percentatges de recuperació dels 6 PAHs després de la purificació mitjançant la cromatografia en columna mixta amb gel de sílice i alúmina i es pot observar que la recuperació dels 6 PAHs es troba entre el 87-118 %. S'aprecia que la tendència de recuperació dels PAHs és molt similar a l'observada mitjançant la purificació SPE amb sílice compactada, ja que el Chry, BaA i Pyr són els que presenten majors recuperacions i el Phe la menor (secció 3.1.2.3). Els percentatges de recuperació juntament amb la RSD del procediment (menor del 5 %) permeten acceptar aquest mètode com a adequat per la purificació dels PAHs.

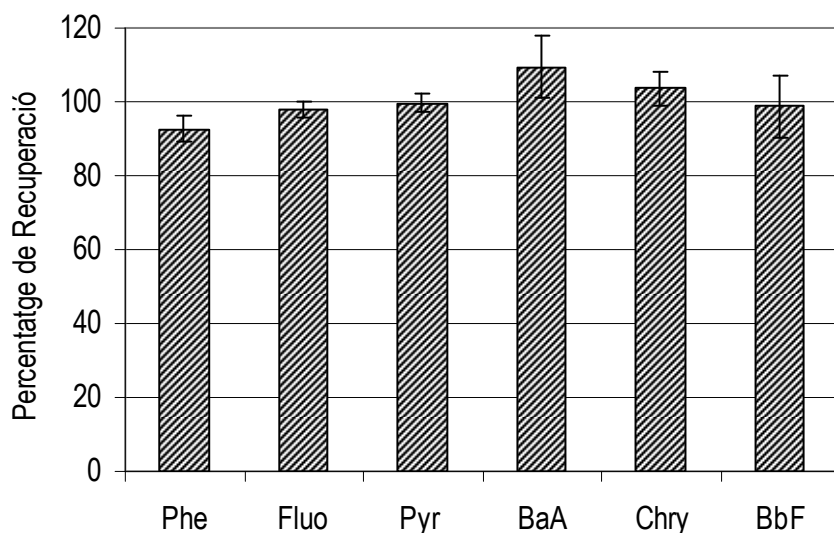


Figura 9. Percentatge de recuperació del mètode de purificació mitjançant la cromatografia en columna mixta amb gel de sílice i alúmina. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació (n=3)

A continuació, a la Taula 2 es mostra un resum comparatiu entre els quatre mètodes de purificació estudiats. Es pot veure que els solvents utilitzats són pràcticament els mateixos, però cal remarcar que el volum utilitzat en les diferents purificacions és notablement diferent. El mètode que consumeix menys solvent és la SPE amb sílice compactada (7 mL/mostra) mentre que el que en consumeix més és la columna amb gel de sílice (90 mL/mostra). Per altra banda, en termes de velocitat de procediment, les dues SPE (menys de 5 min/mostra) s'imposen a les cromatografies en columna (més de 10 min). Els percentatges de recuperació dels PAHs són en general alts (87-118%) exceptuant el cas de la purificació mitjançant SPE C18 (30-36%).

Taula 2. Comparació dels mètodes de purificació dels PAHs

| | SPE C18 | Columna de gel de sílice | SPE amb sílice compactada | Columna mixta de gel de sílice i alúmina |
|-------------------------------|-------------------|---------------------------------|----------------------------------|---|
| Solvents d'elució | Hexà, diclorometà | Pentà, diclorometà | Hexà, diclorometà | Hexà, diclorometà |
| Volum total de solvent | 25 mL/mostra | 90 mL/mostra | 7 mL/mostra | 25 mL/mostra |
| Velocitat procediment | Mitjana | Molt baixa | Mitjana | Molt baixa |
| Recuperació (%) | 30-36 % | 96-100 % | 92-109 % | 87-118 % |
| RSD (%) | 7-51 % | < 15 % | < 10 % | < 5 % |

Així doncs, tant la SPE amb sílice compactada com la columna mixta amb gel de sílice i alumina, són dos mètodes de purificació amb alts percentatges de recuperació dels PAHs, amb l'avantatge que presenten menor RSD i consumeixen menys volum de solvents.

Per tant, vistos els resultats, es decideix repetir les purificacions mitjançant SPE amb sílice compactada i la columna mixta amb gel de sílice i alumina, aplicada, aquest cop, als 16 PAHs considerats com a contaminants prioritari per la USEPA [10]. A la Figura 10 es pot observar que la recuperació dels 16 PAHs mitjançant SPE amb sílice compactada es troba entre el 87-109 % pels 13 primers (Naph-BaP) i del 66-78 % pels tres darrers (I(1,2,3-c,d)P-B(g,h,i)P), la qual cosa és lògica ja que aquests darrers són més apolars i, per tant, no queden tant adsorbits al gel de sílice o bé, si hi queden retinguts, el solvent d'elució no és prou apolar per acabar-los d'eluir completament. Per altra banda, els percentatges de recuperació dels 16 PAHs mitjançant la cromatografia en columna mixta amb gel de sílice i alumina oscil·len entre el 80-119 %. S'aprecia que el Chry, BaA i Pyr són els que presenten majors recuperacions i l'I(1,2,3-c,d)P el que presenta la menor, de la mateixa manera que passa amb la purificació mitjançant SPE amb sílice compactada.

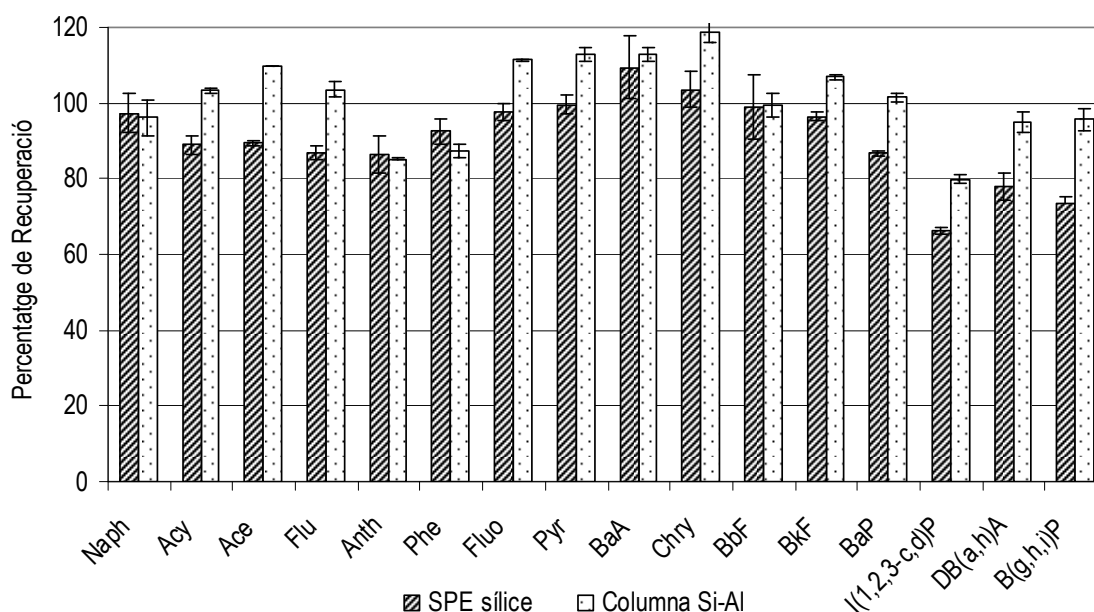


Figura 10. Percentatges de recuperació dels mètodes de purificació SPE amb sílice compactada i columna mixta de gel de sílice i alumina pels 16 PAHs classificats com a contaminants primaris per la US EPA. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació (n=3)

Per tant, aquests dos mètodes de purificació dels PAHs es consideren adequats per a la seva aplicació en mostres de sòls contaminats.

3.1.3. MÈTODES ANALÍTICS D'EXTRACCIÓ

Un cop posat a punt l'anàlisi instrumental mitjançant GC/MS i estudiats els diferents mètodes de purificació, es passa a l'avaluació de dos mètodes d'extracció diferents: l'extracció Soxhlet i l'extracció assistida per microones (MAE). Per a dur a terme els estudis d'extracció Soxhlet i MAE s'utilitza un material de referència certificat (CRM 115-100 Semi VOAs in Soil), i s'analitzen els 6 PAHs seleccionats anteriorment (Phe, Fluo, Pyr, BaA, Chry i BbF).

3.1.3.1. EXTRACCIÓ SOXHLET

Es procedeix a l'extracció dels PAHs del CRM segons les indicacions descrites a l'apartat experimental (secció 2.4.1), seguit del procediment de purificació mitjançant la columna amb gel de sílice. Els percentatges de recuperació dels PAHs presents al CRM oscil·len entre el 62-77 %. El Pyr és el PAH que s'aconsegueix recuperar de forma més efectiva (72 %) i, en segon pla es troben el Fluo (60 %) i el Chry (56 %), valors molt similars entre ells. El RSD es troba entre el 4-11 %. A la Figura 11 es presenten les concentracions trobades després de l'anàlisi del CRM amb l'interval de confiança associat a la incertesa de les diferents extraccions realitzades (mitjana \pm CI_{95 %}, n=3) i l'interval de predicció (PI)[†] dins el qual cal trobar les concentracions dels diferents analits, segons les especificacions del CRM. El Pyr, Fluo i Chry són els únics 3 PAHs que es troben dins d'aquest PI, mentre que el BaA (49%) es troba al límit del rang marcat i el Phe i BbF es troben per sota del límit de quantificació, ja que la concentració inicial al CRM de partida és baixa (0,080 i 0,930 mg·kg⁻¹). S'atribueix la poca recuperació dels compostos a l'extracció Soxhlet, ja que l'etapa de purificació aplicada després de l'extracció és la columna amb gel de sílice ha estat avaluada prèviament a l'apartat anterior (3.1.2.2), observant-se un bon comportament. Per tant, la validació d'aquesta metodologia (Soxhlet-Columna amb gel de sílice-

[†] L'interval de predicció (PI) és un interval que dona informació sobre la probabilitat de que una nova determinació puntual futura es trobi dins d'un rang concret. El PI informa sobre la distribució de valors de la mostra, no de la incertesa en la determinació d'una observació (interval de confiança, CI). Exemple: Es procedeix a la presa de mostra a una àrea concreta seguint una sèrie de protocols establerts, de la qual es vol determinar la concentració de Fenantrè. El CI és la incertesa associada a la determinació de la concentració mitjana de Fenantrè. El PI ens informa de la probabilitat que la determinació de la concentració Fenantrè d'una mostra futura (recollida al mateix lloc en les mateixes condicions que les anteriors) es trobi dins d'un rang concret, anomenat PI. El PI inclou no només la incertesa en la determinació (CI) sinó també la distribució de les dades. Per aquest motiu, el PI és un interval més ampli que el CI.

GC/MS) per l'anàlisi dels no s'ha realitzat de manera satisfactòria. Vista la poca eficiència d'extracció dels compostos d'interès, es decideix provar un altre mètode d'extracció; l'extracció assistida per microones (MAE).

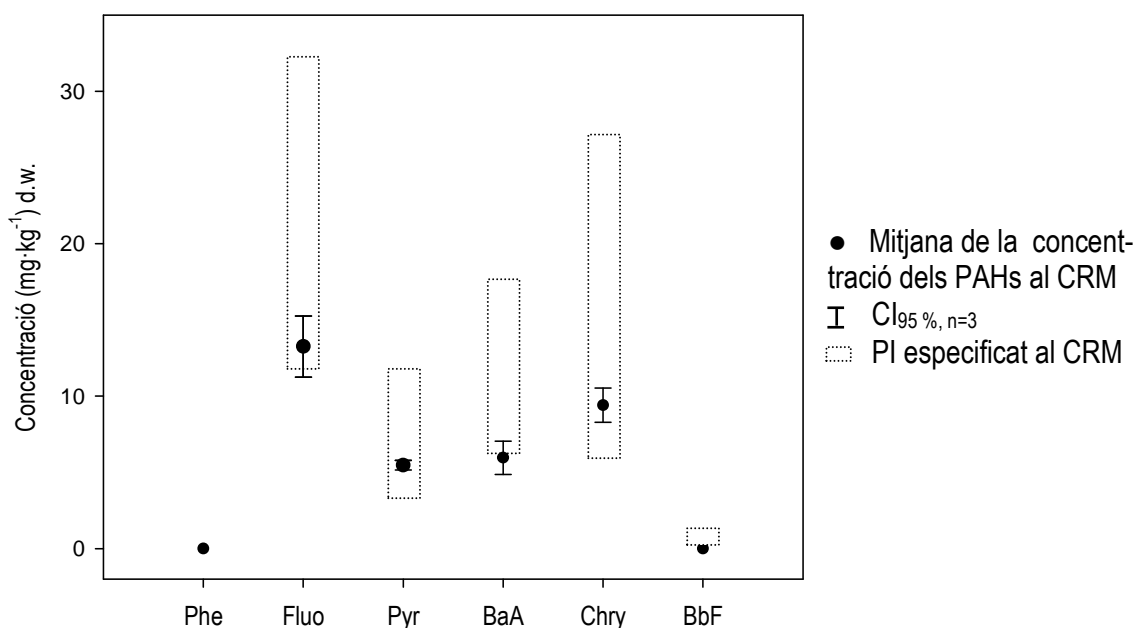


Figura 11. Concentració de PAHs trobada en l'anàlisi del CRM després de l'extracció Soxhlet seguida de la purificació mitjançant la columna amb gel de sílice. Pel Phe no s'indica ni el CI ni el PI donat que la seva concentració no es troba certificada al CRM

3.1.3.2. EXTRACCIÓ ASSISTIDA PER MICROONES

Es procedeix a l'extracció dels PAHs del CRM segons les indicacions descrites a l'apartat experimental (secció 2.4.2). En aquest cas, l'extracte del MAE se sotmet als altres dos mètodes de purificació, la SPE amb sílice compactada i la columna mixta amb gel de sílice i alumina, que ja havien demostrat ser més eficients, econòmics i ràpids.

Pel cas del MAE seguit de la SPE amb sílice compactada i l'anàlisi instrumental per GC/MS, els percentatges de recuperació dels PAHs presents al CRM oscil·len entre el 92-127 %, mostrant que la recuperació de tots ells és efectiva. Es recupera un 127 % de BaA, 106 % de BbF i Chry, 101 % de Pyr, 100 % de Fluo i, finalment, el 92 % de Phe. La RSD es troba per sota del 10 % (entre el 2-9 %). A la Figura 12 es presenten les concentracions trobades dels PAHs després de l'anàlisi del CRM amb l'interval de confiança associat a la incertesa de les diferents extraccions realitzades (mitjana \pm CI_{95%}, n=3) i l'interval de predicció dins el qual cal trobar les concentracions dels diferents analits, segons les especificacions del CRM. Tots els PAHs es troben dins del PI

del CRM, a diferència del que passava amb l'extracció Soxhlet. A més, en aquest cas, el Phe i el BbF es poden quantificar sense cap problema donada l'alta eficiència del MAE i de la purificació mitjançant SPE amb sílice compactada, cosa que no passa en utilitzar l'extracció Soxhlet. Per tant, la validació d'aquesta metodologia (MAE-SPE amb sílice compactada-GC/MS) per l'anàlisi de PAHs en mostres de sòls s'ha realitzat de manera satisfactòria.

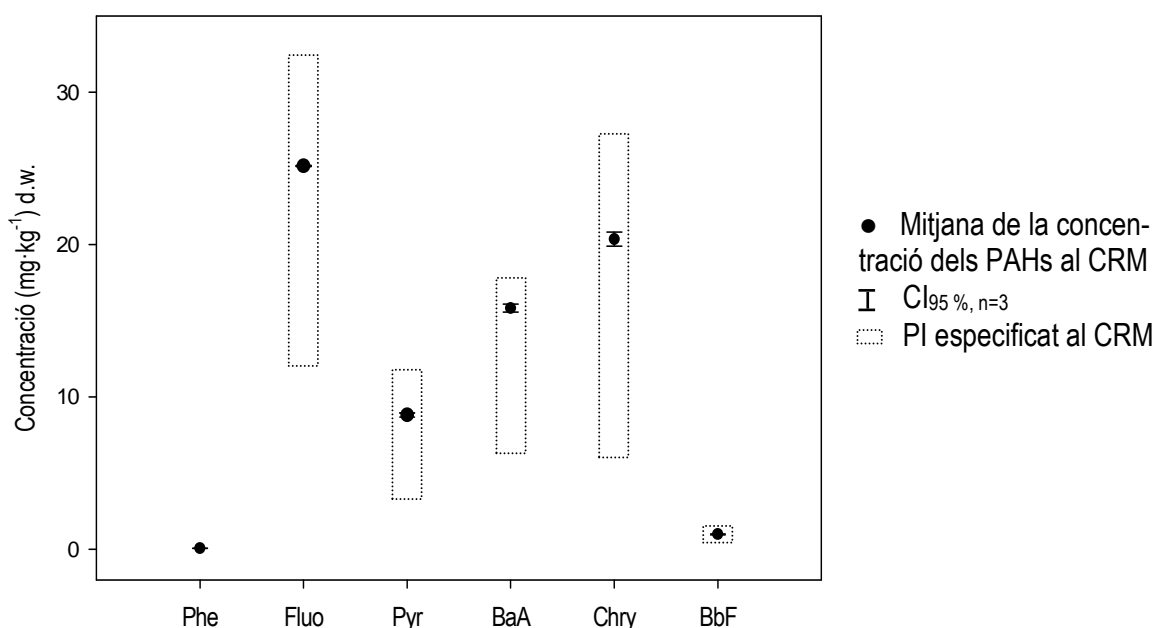


Figura 12. Concentració de PAHs trobada en l'anàlisi del CRM després del MAE, seguit de la purificació mitjançant SPE amb sílice compactada. Pel Phe no s'indica ni el CI ni el PI donat que la seva concentració no es troba certificada al CRM

Pel cas del MAE seguit de la columna mixta amb gel de sílice i alúmina i l'anàlisi instrumental per GC/MS s'obtenen percentatges de recuperació dels PAHs presents al CRM d'entre el 86-131 %. En aquest cas, tret del Phe (86 %), els demés PAHs presenten percentatges de recuperació similars, propers al 100 %. La RSD es troba per sota del 5 % (entre l'1-3 %). A la Figura 13 es presenten les concentracions trobades dels PAHs després de l'anàlisi del CRM amb l'interval de confiança associat a la incertesa de les diferents extraccions realitzades (mitjana \pm CI_{95%}, n=3) i l'interval de predicció dins el qual, segons les especificacions del CRM, cal trobar les concentracions dels diferents analits. Tots els PAHs es troben dins del PI del CRM, tal i com passava pel cas anterior del MAE i la purificació mitjançant SPE amb sílice compactada. Per tant, la validació d'aquesta metodologia (MAE-columna mixta amb gel de sílice i alúmina-GC/MS) per l'anàlisi de PAHs en mostres de sòls s'ha realitzat de manera satisfactòria.

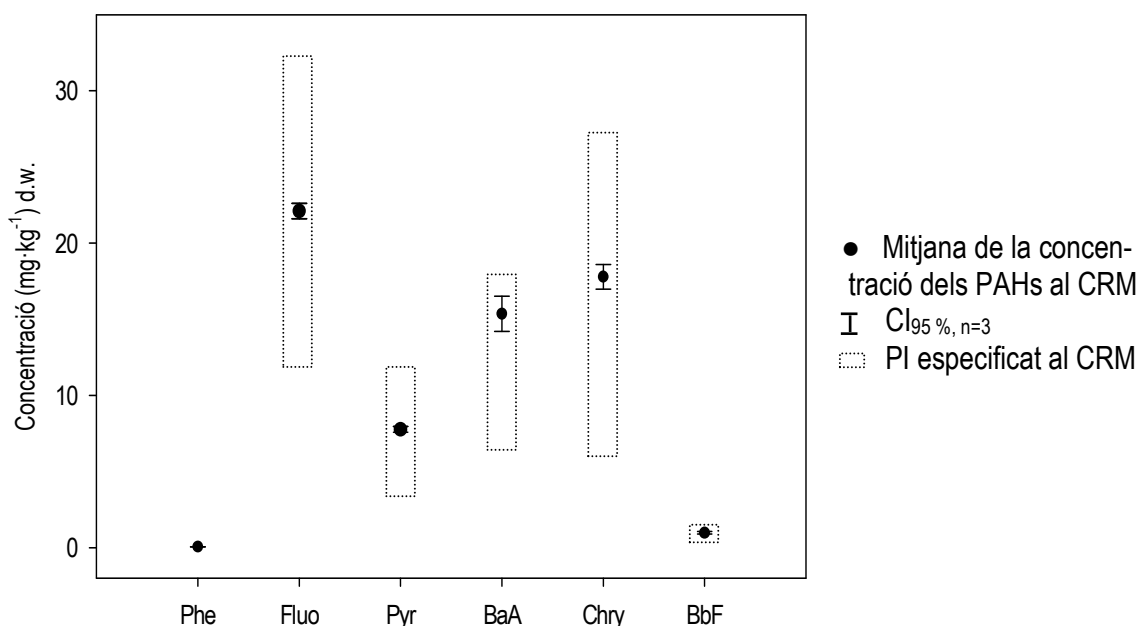


Figura 13. Concentració de PAHs trobada en l'anàlisi del CRM després del MAE, seguit de la purificació mitjançant la columna mixta amb gel de sílice i alumina. Pel Phe no s'indica ni el CI ni el PI donat que la seva concentració no es troba certificada al CRM

En vista dels resultats obtinguts dels estudis sobre els diferents mètodes d'extracció, purificació i anàlisi instrumental, es pot concloure que la metodologia més adequada per l'anàlisi de PAHs en sòls inclou tres etapes: una primera etapa d'extracció mitjançant el microones (MAE), seguida d'una etapa de purificació (SPE amb sílice compactada o bé columna mixta amb gel de sílice i alumina) i l'anàlisi instrumental per GC/MS. A la Taula 3 es presenten els resultats dels límits de detecció (MDL) i quantificació (MQL) de les darreres metodologies, on es pot veure que són quasi idèntics, calculats multiplicant els DL i QL de la tècnica instrumental de la Taula 1 ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) pel volum de solvent extractant (20,00 mL), dividint pel pes de mostra (1,00000 g), corregint amb els percentatges de recuperació dels diferents PAHs.

Taula 3. Límits de detecció (MDL) i quantificació (MQL) del mètode MAE-SPE sílice compactada-GC/MS i MAE-columna mixta de gel de sílice i alúmina-GC/MS

| PAHs | <u>MAE-SPE sílice compactada-GC/MS</u> | | <u>MAE-Columna mixta amb gel de sílice i alúmina-GC/MS</u> | |
|------|---|---|--|---|
| | MDL ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) | MQL ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) | MDL ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) | MQL ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) |
| Phe | 0,002 | 0,008 | 0,002 | 0,008 |
| Fluo | 0,005 | 0,017 | 0,006 | 0,020 |
| Pyr | 0,005 | 0,017 | 0,006 | 0,020 |
| BaA | 0,017 | 0,057 | 0,018 | 0,059 |
| Chry | 0,019 | 0,064 | 0,022 | 0,073 |
| BbF | 0,053 | 0,174 | 0,053 | 0,174 |

3.1.4. EFECTE DEL PRETRACTAMENT DE MOSTRA: TAMISAT I MÒLTA

Un cop avaluades les diferents possibilitats per l'anàlisi dels PAHs, es decideix portar a terme un estudi per comprovar si el pretractament de mostra al qual se sotmeten els sòls influeix sobre els resultats d'aquestes anàlisis. En concret, s'anitzen tres sòls diferents un cop sotmesos a l'acció de tamisat, de mòlta o bé a les dues accions (tamisat i mòlta). Es vol determinar si s'observen diferències en la determinació de la composició de la mostra abans i després del procés de mòlta i, per altra banda, es vol resoldre si la discriminació de les diferents partícules del sòl en funció de la seva mida, a través de l'anomenat tamisat, comporta una pèrdua d'informació en l'anàlisi dels PAHs dels sòls. L'esquema seguit per tal de determinar la influència del pretractament de mostra en les anàlisis es presenta a la Figura 14.

Els resultats de les anàlisis de les diferents fraccions es mostren a la Taula 4, on es pot observar que les fraccions corresponents al tamisat de la mostra (A) i la corresponent al tamisat i mòlta (B) presenten diferències significatives[‡] en la concentració total dels PAHs. Les dues submostres (A i B) provenen de la mateixa mostra inicial, la qual es tamisa per sota de 2 mm i la fracció A' es mol fins aconseguir partícules de mida 100 μm . Després d'aquesta operació, pels tres sòls estudiats, es troba una major concentració dels PAHs a aquesta fracció resultant (B).

[‡] Les diferències significatives s'han comprovat mitjançant la realització primer d'un test F per comprovar la igualtat de variàncies i després un test T, per comprovar diferències entre mitjanes (els càlculs es poden veure a l'Annex 4).

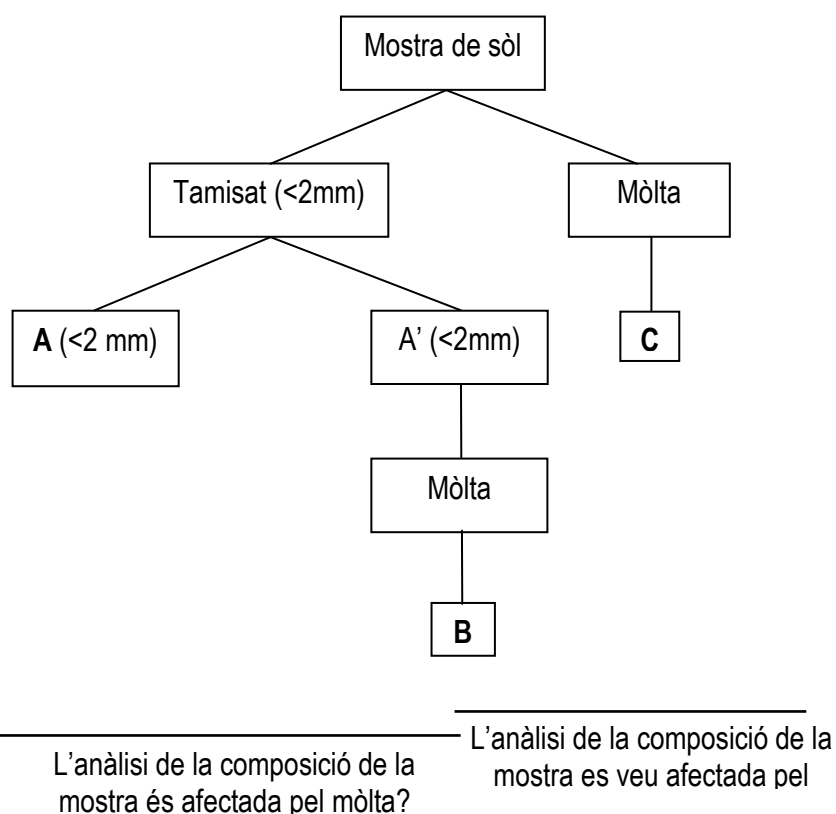


Figura 14. Esquema de l'estudi dissenyat per determinar la influència dels procediments de pretractament de mostra: tamisat i mòlta

Taula 4. Concentració de PAHs després de diferents operacions de pre-tractament de mostra

| Σ PAHs ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) ^{a,b} | Tamisat (A) | Tamisat i Mòlta (B) | Mòlta (C) |
|---|-------------|---------------------|-----------|
| Polinyà | 40 ± 5 | 47 ± 4 | 48 ± 3 |
| Sant Quirze | 220 ± 8 | 254 ± 9 | 153 ± 20 |
| Terrassa | 55 ± 6 | 66 ± 7 | 57 ± 7 |

^a Σ PAHs inclou el Phe, Fluor, Pyr, BaA i BbF, ^b mitjana ± CI₉₅ %, n=2

Assumint que A i A' presenten una distribució homogènia dels PAHs, l'observació de diferències de concentració entre A i B indica que els resultats de les anàlisis es veuen afectats per la mòlta de la mostra. De fet, quan es tamisa el sòl, només se seleccionen les partícules de mida inferior a 2 mm i és a la superfície d'aquestes on es troben adsorbits els PAHs que s'extreuen i analitzen. En moldre, els PAHs adsorbits a l'interior de les cavitats de les partícules més grosses són alliberats i es troben més accessibles pels solvents orgànics utilitzats en l'extracció. Ja fa temps, Karichkoff (1980) i Robinson *et al.* (1990) van determinar que existeix un mecanisme d'adsorció de tipus hidròfob que està involucrat en les interaccions entre els PAHs i el sòl. En un primer pas,

els PAHs són adsorbits ràpidament a la superfície del sòl per interaccions hidròfobes i, en un segon pas, es dona una migració lenta dels PAHs cap a les zones menys accessibles del sòl [11,12].

Es pot concloure, doncs, que la mòlta té un efecte significatiu en l'anàlisi de les mostres ja que permet alliberar els PAHs que es troben segrestats a l'interior de les diferents partícules i no només els adsorbits superficialment. Pels sòls de Polinyà i Terrassa, l'aplicació del tamisat i mòlta resulta en un augment del 20 % respecte la concentració trobada només tamisant, i pel sòl de Sant Quirze l'augment és del 15 %.

Per altra banda, per comprovar l'efecte de la mida de partícula, una tercera submostra se sotmet directament al procés de mòlta, sense etapa prèvia de tamisat, constituint la fracció C. Aquesta fracció inclou les partícules de mida més petita així com d'altres de major mida i pedres constituents del sòl. L'observació de diferències en la concentració dels PAHs a les fraccions B (tamisat i mòlta) i C (mòlta) indica que existeix una certa influència de l'etapa de tamisat a la qual s'havia sotmès la fracció B. Els resultats mostren que, amb excepció del sòl de Polinyà (al qual es troba la mateixa concentració de PAHs a les fraccions B i C), la quantitat de PAHs després de moldre (C) és inferior a la trobada després de tamisar i moldre (B), i aquestes diferències són més acusades a mesura que augmenta la concentració dels PAHs a la mostra de sòl. En aplicar primer l'operació de mòlta es determina un 40 % menys dels PAHs al sòl de Sant Quirze i del 14 % menys pel de Terrassa que en aplicar tamisat i mòlta, resultats que es poden justificar per diferents factors. Per una banda, encara que els PAHs puguin migrar a l'interior de les partícules més grosses, Murphy *et al.* (1990) van comprovar que aquest procés s'atura quan la capacitat d'incorporació de la matriu del sòl es troba exhaurida i s'arriba a un equilibri [13] i és a la superfície de les partícules on s'adsorbeixen més els PAHs. A més, Conte *et al.* (2001) van comprovar que aquesta adsorció superficial es veu incrementada gràcies a la presència de matèria orgànica (substàncies húmiques), la qual facilita l'estabilització de les interaccions hidròfobes entre els PAHs i la superfície del sòl [14]. Així doncs, tenint en compte que la majoria dels PAHs es troben adsorbits superficialment, cal tenir present que la mòlta de partícules de diferent mida (grans i petites) front a la mòlta de partícules de menys de 2 mm de diàmetre, implica la introducció d'un efecte de dilució dels PAHs, ja que les partícules més petites presenten una major superfície específica. Per tant, és d'esperar que la quantitat de PAHs determinada sigui menor en moldre directament el sòl sense l'operació de tamisar. Es veu, doncs,

que l'aplicació del tamisat també és un factor influent en la determinació de la concentració dels PAHs en sòls.

Així doncs, es comprova que les operacions de pretractament de mostra són necessàries per dur a terme una determinació de la concentració dels PAHs correcta, fiable i exacte, en mostres de sòls contaminats, sobretot, quan la concentració dels analits es troba a nivell traça. Per aquest motiu, les mostres que s'analitzaran al llarg d'aquesta tesi doctoral se sotmetran a una etapa de tamisat i mòlta.

3.2. ANÀLISI D'HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS MONOHIDROXILATS (OH-PAHs)

En aquest apartat es presenten els resultats associats al desenvolupament d'un nou mètode d'anàlisi d'alguns productes de degradació dels PAHs, els hidrocarburs aromàtics policíclics monohidroxilats (OH-PAHs). La necessitat del desenvolupament d'aquest mètode apareix com a resposta a la poca oferta existent per l'anàlisi d'aquests compostos, especialment en sòls [18,23]. A més, tant en sòls com en altres matrius, el mètode tradicional seguit després de l'extracció dels OH-PAHs inclou, generalment, una reacció de derivatització per sililació de l'extracte, previ a l'anàlisi per GC/MS [15,18,20,21,22], la qual comporta algunes limitacions, sobretot en termes de velocitat i sensibilitat d'anàlisi i aparició d'interferències. Per aquests motius es decideix desenvolupar un nou mètode d'anàlisi pels OH-PAHs, més ràpid, amb millors MDL i MQL i lliure d'interferències, mitjançant la introducció d'una purificació selectiva després de l'extracció per microones i una detecció per fluorescència un cop separats per HPLC, aprofitant les característiques fluorescents dels OH-PAHs. Durant el desenvolupament del nou mètode s'optimitzen les condicions d'extracció (temperatura, mescla de solvents extractants), les condicions de la nova etapa de purificació selectiva, mitjançant l'extracció en fase sòlida basada en polímers impremtats molecularment (solvents i volum d'elució), així com els paràmetres de l'anàlisi cromatogràfica mitjançant la cromatografia líquida d'alta resolució amb detecció per fluorescència (HPLC/FLD).

Finalment, es comparen els avantatges i inconvenients d'aquest nou mètode amb el mètode tradicional per GC/MS (l'esquema dels dos mètodes d'anàlisi es mostra a la Figura 15), i s'estudia la possibilitat de la seva aplicació a mostres reals, partir de l'anàlisi de dos microcosmos als quals s'espera observar l'aparició dels OH-PAHs com a productes de la degradació dels PAHs.

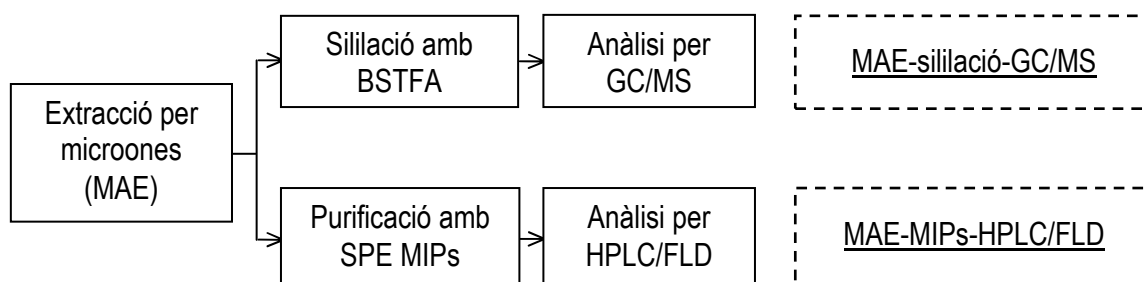


Figura 15. Esquema de les dues metodologies utilitzats per l'anàlisi dels OH-PAHs

Tant per dur a terme el desenvolupament del nou mètode com per la reproducció del més tradicional se seleccionen tres OH-PAHs representatius amb dos, tres i quatre anells aromàtics (2-OHNaph, 9-OHPhen i 1-OHPyr, respectivament), per cobrir un rang ampli d'OH-PAHs i poder així seleccionar les millors condicions per la seva anàlisi. Igual que en el cas anterior per l'anàlisi dels PAHs (secció 3.1), es comença per l'optimització de l'anàlisi cromatogràfica i s'acaba per l'etapa d'extracció per microones.

3.2.1. ANÀLISI DELS OH-PAHs

3.2.1.1. SILILACIÓ-GC/MS

Seguint el mètode optimitzat descrit a l'apartat experimental (secció 2.6.4.2), s'analitzen una sèrie de mesclures patró dels OH-PAHs preparats a partir dels patrons sòlids purs dissolts en acetonitril. El calibratge es prepara entre 0,200 i 4,000 mg·L⁻¹ després de procedir a la sililació de les solucions dels OH-PAHs. S'utilitza Phe-D₁₀ com a patró intern, afegit a una concentració d'1,000 mg·L⁻¹. Per comprovar la linealitat de la regressió realitza una anàlisi de variància (ANOVA). A la Taula 5 es poden veure els paràmetres de la regressió lineal, així com els límits de detecció (DL) i quantificació (QL) de la tècnica instrumental. La determinació dels límits de detecció (DL) i quantificació (QL) es realitza basant-se en la relació senyal/soroll. Es comparen els senyals mesurats de patrons a baixes concentracions dels analits (0,100 a 1,000 µg·L⁻¹) amb el senyal del blanc i establint la mínima concentració a la qual l'analit pot ser detectat amb fiabilitat. Una relació senyal/soroll de 3 vegades es considera acceptable per l'estimació del DL, i de 10 per l'estimació del QL.

Taula 5. Paràmetres de regressió del calibratge dels OH-PAHs mitjançant sililació-GC/MS

| OH-PAHs | Temps de retenció (min) | Rang estudiat ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | $y = ax + b$ | | r^2 | DL ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) | QL ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) |
|----------|-------------------------|--|-------------------|-------------------|-------|--|--|
| | | | $a \pm \text{SD}$ | $b \pm \text{SD}$ | | | |
| 2-OHNaph | 8,10 | 0,200-4,000 | $0,64 \pm 0,01$ | $-0,02 \pm 0,02$ | 0,999 | 7,51 | 24,78 |
| 2-OHFlu | 13,70 | 0,200-4,000 | $0,74 \pm 0,01$ | $-0,04 \pm 0,03$ | 0,999 | 1,90 | 6,27 |
| 9-OHPhe | 15,80 | 0,200-4,000 | $0,60 \pm 0,01$ | $-0,06 \pm 0,02$ | 0,999 | 3,10 | 10,23 |
| 1-OHPyr | 22,65 | 0,200-4,000 | $0,65 \pm 0,02$ | $-0,07 \pm 0,05$ | 0,995 | 5,82 | 19,21 |

A la Figura 16 es mostra el cromatograma corresponent a la separació de quatre OH-PAHs d'una dissolució patró d'1,000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ en les condicions de separació optimitzades descrites a l'apartat experimental (secció 2.6.4.2). Es pot veure que la separació s'aconsegueix en un total de 23 min (15 min des de l'aparició del primer, 2-OHNaph, fins a l'elució del darrer, 1-OHPyr). Anteriorment s'ha comentat que el desenvolupament dels mètodes es fa a partir de tres OH-PAHs representatius (2-OHNaph, 9-OHPhe i 1-OHPyr), i tant a la Taula 5 com en aquest cromatograma se'n mostren quatre (inclou el 2-hidroxifluorè, 2-OHFlu). Es decideix introduir aquest nou OH-PAH després del desenvolupament del mètode amb els tres OH-PAHs representatius ja que s'observen altes concentracions de Fluorè (Flu) al sòl utilitzat en un primer estudi de degradació dels PAHs, el qual és susceptible a ser degradat a 2-OHFlu pels microorganismes presents al sòl [16].

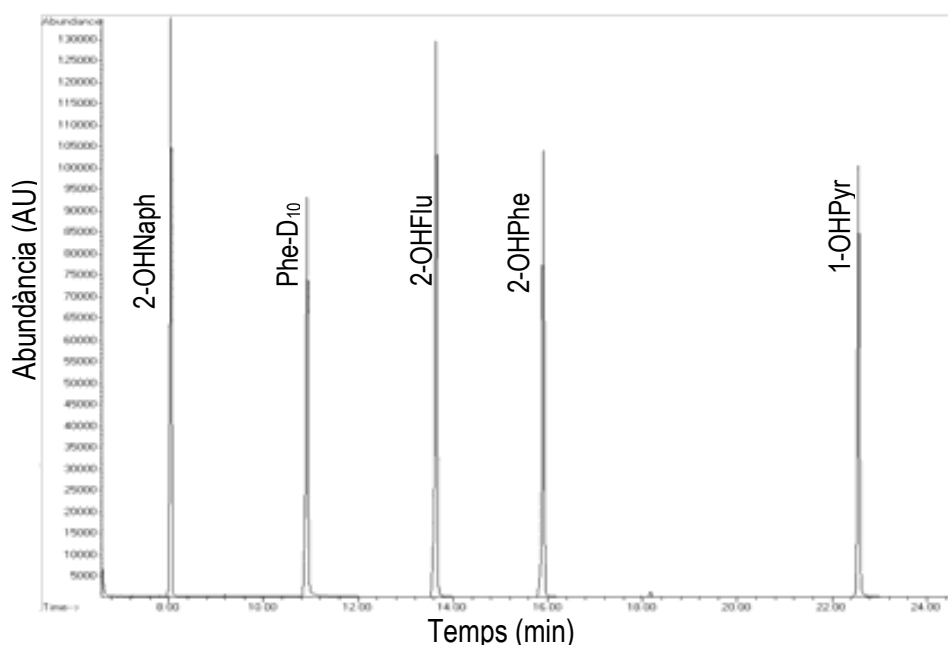


Figura 16. Cromatograma corresponent a l'anàlisi d'una dissolució patró d'1,000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dels quatre OH-PAHs sililats per GC/MS

3.2.1.2. CROMATOGRAFIA LÍQUIDA D'ALTA RESOLUCIÓ AMB DETECTOR DE FLUORESCÈNCIA (HPLC/FLD)

Per poder optimitzar les condicions de separació dels OH-PAHs mitjançant HPLC/FLD primer de tot cal determinar les longituds d'ona d'excitació i emissió òptimes per poder-los detectar. Es preparen dissolucions individuals de 0,100 mg·L⁻¹ en acetonitril a partir dels patrons individuals sòlids de cadascun des OH-PAHs i es registra el seu espectre amb un espectrofotòmetre de fluorescència (Varian, model Cary Eclipse). Es realitza un escombrat entre 300-800 nm per determinar-ne la longitud d'ona d'excitació. A continuació es fixa aquesta longitud d'ona òptima d'excitació i es registra novament l'espectre per determinar la longitud d'ona d'emissió (al mateix rang). A la Figura 17 es pot veure l'espectre d'emissió de fluorescència del 2-OHFlu després de ser excitat a 272 nm, amb una longitud d'ona d'emissió òptima de 326 nm.

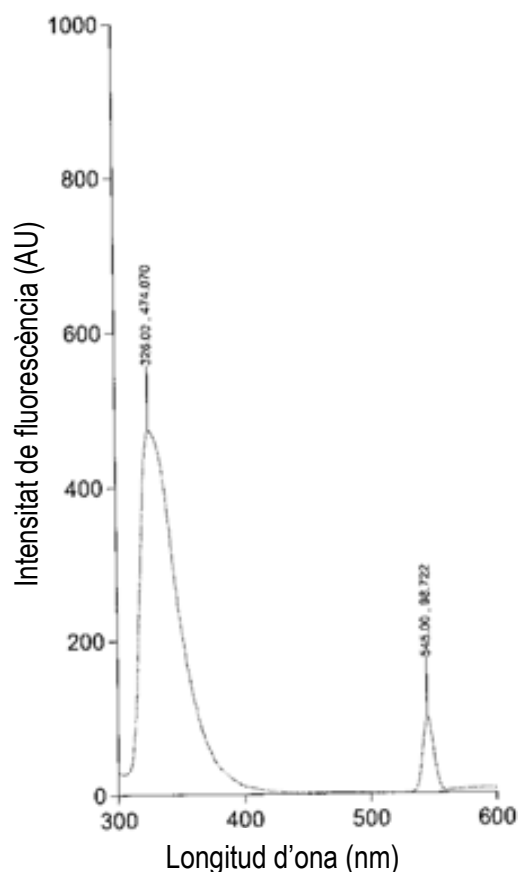


Figura 17. Espectre d'emissió de fluorescència del 2-OHFlu després de fixar la longitud d'ona d'excitació a 272 nm

Un cop determinades les longituds d'emissió òptimes dels OH-PAHs, s'analitzen una sèrie de patrons per tal d'optimitzar la separació i la identificació de cadascun d'ells. El calibratge es

prepara entre 0,002 i 0,100 mg·L⁻¹ i per comprovar la linealitat de la regressió es realitza una anàlisi de variància (ANOVA). A la Taula 6 es poden veure els paràmetres de la regressió lineal, així com els límits de detecció (DL) i quantificació (QL) de la tècnica instrumental. La determinació dels límits de detecció (DL) i quantificació (QL) es realitza basant-se en la relació senyal/soroll. Es comparen els senyals mesurats de patrons a baixes concentracions dels analits (0,100 a 1,000 µg·L⁻¹) amb el senyal del blanc i establint la mínima concentració a la qual l'analit pot ser detectat amb fiabilitat. Una relació senyal/soroll de 3 vegades es considera acceptable per l'estimació del DL, i de 10 per l'estimació del QL.

Taula 6. Paràmetres de regressió del calibratge dels OH-PAHs mitjançant HPLC/FLD

| OH-PAHs | Temps de retenció (min) | Rang estudiat (µg·mL ⁻¹) | y = ax + b | | r ² | DL (µg·L ⁻¹) | QL (µg·L ⁻¹) |
|----------|-------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|----------------|--------------------------|--------------------------|
| | | | a ± SD (x10 ⁻⁷) | b ± SD (x10 ⁻⁴) | | | |
| 2-OHNaph | 3,40 | 0,002-0,100 | 37,9 ± 0,5 | 29,9 ± 10,4 | 0,999 | 0,10 | 0,33 |
| 2-OHFlu | 5,31 | 0,002-0,100 | 24,1 ± 0,3 | 28,9 ± 14,1 | 0,998 | 0,13 | 0,43 |
| 9-OHPhen | 6,76 | 0,002-0,100 | 7,9 ± 0,1 | -8,4 ± 3,9 | 0,999 | 0,25 | 0,82 |
| 1-OHPyr | 8,64 | 0,002-0,100 | 4,5 ± 0,2 | -29,8 ± 10,4 | 0,967 | 0,37 | 1,22 |

A la Figura 18 es mostra el cromatograma corresponent a la separació de quatre OH-PAHs d'una dissolució patró de 0,020 mg·L⁻¹ en les condicions de separació optimitzades descrites a l'apartat experimental (secció 2.6.3). Es pot veure que la separació s'aconsegueix en menys de 9 min (6 min des de l'aparició del primer, 2-OHNaph, fins a l'elució del darrer, 1-OHPyr).

Un cop optimitzada la separació i detecció dels OH-PAHs per GC/MS i HPLC/FLD es procedeix a l'optimització de l'etapa de purificació (emprant la tecnologia dels polímers impremtats molecularment com a novetat) i de l'extracció per microones. Per fer-ho, es procedeix a dopar una part del sòl recollit a Yvetot amb OH-PAHs tal i com es troba descrit a l'apartat experimental (secció 2.9.1) i, a partir d'aquí, s'estudien els paràmetres més rellevants de cadascun de les etapes de purificació.

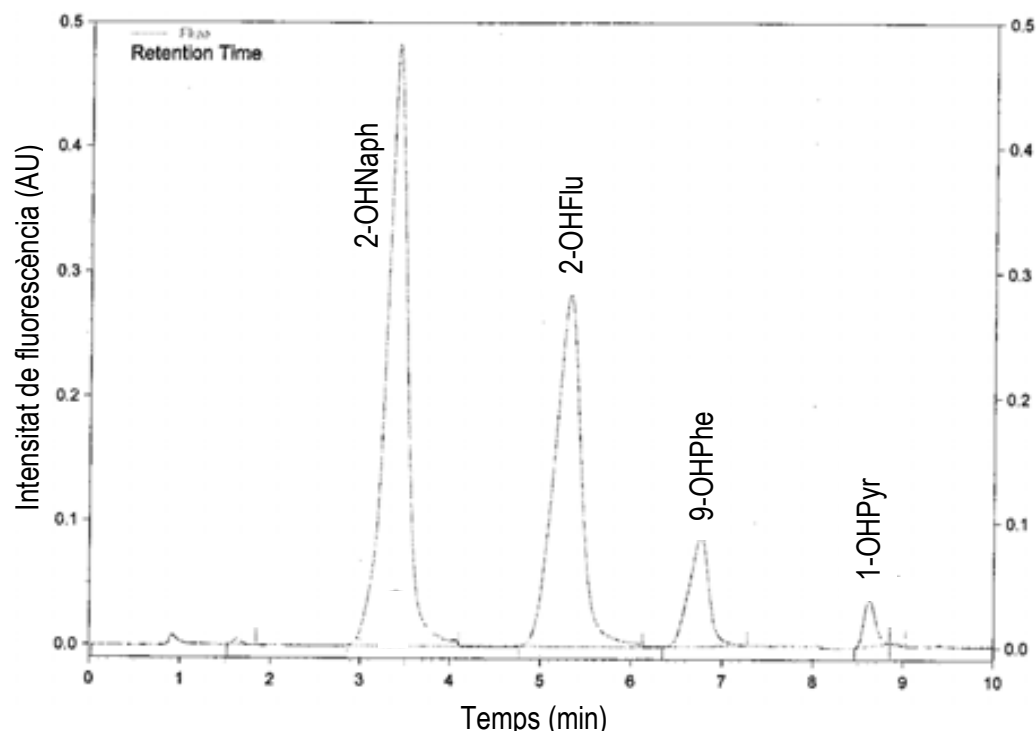


Figura 18. Cromatograma corresponent a l'anàlisi d'una dissolució de $0,020 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dels quatre OH-PAHs per HPLC/FLD

3.2.2. PURIFICACIÓ MITJANÇANT POLÍMERS IMPREMTATS MOLECULARMENT (MIPs): ELECCIÓ DEL VOLUM I SOLVENTS D'ELUCIÓ ÒPTIMS

Els resultats de l'avaluació de diferents mescles de solvents per portar a terme l'elució dels OH-PAHs durant la purificació SPE MIPs es recullen a la Figura 19. En aquesta es mostren els percentatges de recuperació dels OH-PAHs després d'utilitzar, com a solvents d'elució, metanol (amb o sense diferents percentatges d'àcid acètic, fòrmic i TFA) i etanol (amb 2 % d'àcid acètic). En general, per tots els solvents, s'obtenen millors recuperacions pel 2-OHNaph, seguit del 9-OHPhe i finalment de l'1-OHPyr, la qual cosa sembla raonable ja que els MIPs es van desenvolupar per a la purificació selectiva de compostos fenòlics amb un sol anell benzènic, segons la informació del fabricant. Així doncs, com major és el nombre d'anells de benzè dels compostos, menys eficient és l'encaix dels analits als porus del polímer impregnat.

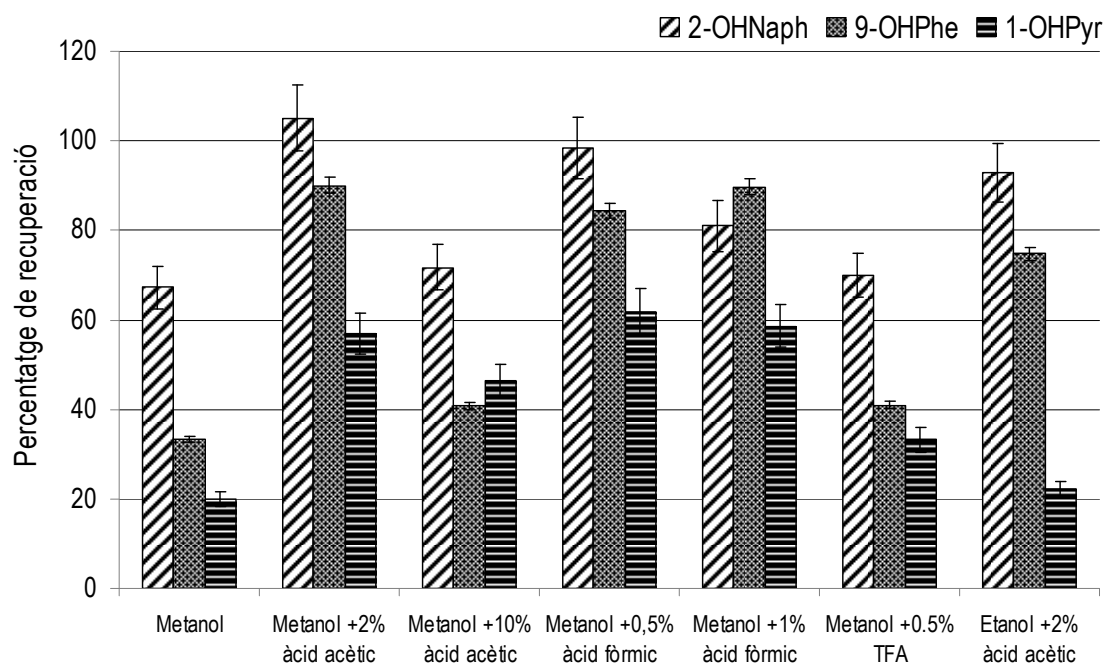


Figura 19. Percentatge de recuperació del 2-hidroxi-naftalè (2-OHNaph), 9-hidroxifenantrè (9-OHPhe) i 1-hidroxipirè (1-OHPyr) després de la purificació mitjançant SPE MIPs amb 5,00 ($\pm 0,02$) mL de diferents solvents d'elució. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació ($n=3$)

També s'observa que l'ús del metanol sense presència d'àcid és menys eficient per eluir els OH-PAHs, ja que els àcids són necessaris per trencar els ponts d'hidrogen formats entre les cavitats impremtades del polímer i els grups hidroxil dels OH-PAHs. Amb l'etanol s'assoleixen recuperacions inferiors a les obtingudes amb el metanol, probablement per la seva menor polaritat. Es pot observar que hi ha tres combinacions que proporcionen resultats similars (metanol amb un 2 % d'àcid acètic i les dues combinacions realitzades amb àcid fòrmic). Tanmateix, sembla que la primera és la millor opció per l'elució dels OH-PAHs durant el procés de purificació mitjançant SPE MIPs.

Per altra banda, s'estudia el volum òptim de solvent d'elució (metanol amb un 2 % d'àcid acètic). Tal i com es pot veure a la Figura 20, com més gran és el volum utilitzat, major és la recuperació, particularment pel cas de l'1-OHPyr, el qual és el més difícil d'eluir. Pel 9-OHPhe, el volum òptim d'elució sembla ser al voltant de 4,00 ($\pm 0,02$) mL, i pel 2-OHNaph, el màxim es veu entre 5,00 ($\pm 0,02$) i 6,00 ($\pm 0,02$) mL. Així doncs, se seleccionen 6,00 mL de metanol amb 2 % d'àcid acètic com el volum d'elució òptim.

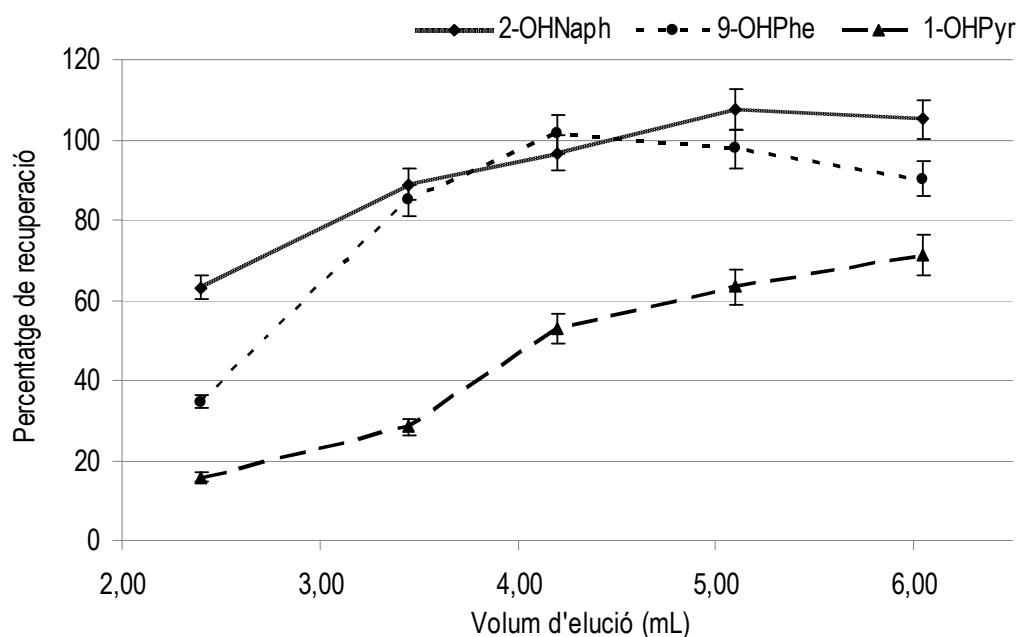


Figura 20. Percentatge de recuperació del 2-hidroxinaftalè (2-OHNaph), 9-hidroxifenantrè (9-OHPhe) i 1-hidroxipirè (1-OHPyr) després de la purificació mitjançant SPE MIPs amb diferents volums de metanol amb un 2 % d'àcid acètic. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment de purificació (n=3)

3.2.3. EXTRACCIÓ ASSISTIDA PER MICROONES: ELECCIÓ DELS SOLVENTS I TEMPERATURA ÒPTIMS

Un cop avaluada la purificació mitjançant SPE MIPs, es procedeix a l'optimització de l'etapa d'extracció. En tractar-se del desenvolupament d'un nou mètode d'anàlisi per OH-PAHs en sòls, se seleccionen deu mesclades de solvents diferents per tal de determinar quin/s permeten obtenir millors recuperacions dels tres analits d'interès (2-OHNaph, 9-OHPhe i 1-OHPyr). Les demés condicions d'extracció es fixen per tal d'obtenir resultats comparables: 25,00 ($\pm 0,03$) mL de mescla de solvents extractant, 120 °C i 1200 W, al llarg de 30 min. A continuació, els extractes es purifiquen mitjançant SPE MIPs, utilitzant com a solvent d'elució la mescla metanol:àcid acètic (98:2) i s'analitzen mitjançant HPLC/FLD.

A la Figura 21 s'observen variacions importants en les recuperacions dels OH-PAHs, per una banda, degut a la feble capacitat d'extracció d'alguns solvents i, per l'altra, perquè alguns d'ells no són probablement compatibles amb els MIPs utilitzats en l'etapa de purificació. Es pot observar que les extraccions més eficients es donen quan s'utilitza acetonitril pur i algunes de les combinacions amb diferents percentatges de toluè i acetona. En canvi, en els casos en què s'acidifica o s'addiciona una base, com el HCl i NaOH respectivament, o quan s'utilitza THF (els

quals contribueixen a l'inflament del polímer i en canvien la mida i volum de les cavitats que permeten el reconeixement molecular), s'observen només recuperacions pobres pel 2-OHNaph. Per tant, aquestes últimes combinacions no són una bona elecció com a mescles per a l'extracció dels OH-PAHs del sòl.

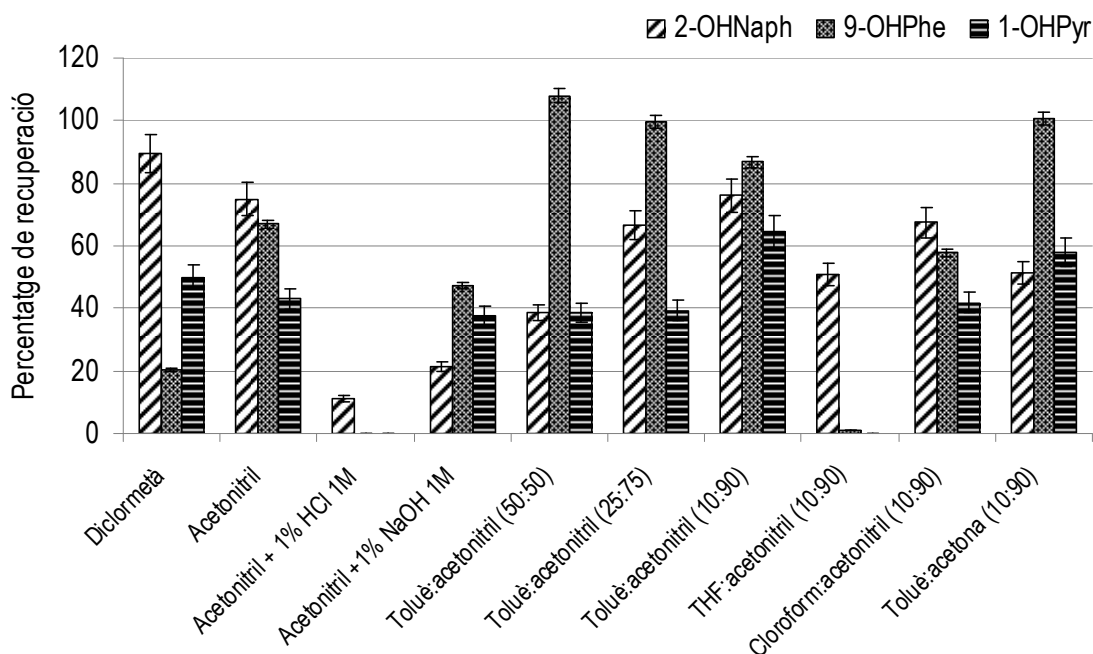


Figura 21. Percentatge de recuperació del 2-hidroxi-naftalè (2-OHNaph), 9-hidroxi-fenantrè (9-OHPhe) i 1-hidroxi-pirè (1-OHPyr) en funció de la mescla de solvents extractant utilitzat per l'extracció assistida per microones. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment d'extracció (n=3)

També es pot observar que la recuperació pel 9-OHPhe es veu afavorida en augmentar la quantitat de toluè afegida a l'acetonitril, però la recuperació del 2-OHNaph empitjora de forma progressiva. Així doncs, les combinacions dels solvents més adequada per a l'extracció per microones són l'acetonitril pur o l'acetonitril amb un 10 % de toluè, ja que no s'observa un augment significatiu dels percentatges de recuperació per l'1-OHPyr en afegir un 25 o 50 % de toluè a l'acetonitril.

Per optimitzar la temperatura d'extracció es porten a terme tres extraccions a 100, 120 i 140 °C, seguides de la purificació mitjançant SPE MIPs i l'anàlisi per HPLC/FLD. Se selecciona un màxim de 30 min ja que es va demostrar que aquest era el temps òptim en estudis previs d'extracció de PAHs de matrius sòlides, de les quals és particularment complicat extreure'ls [17]. Tal i com es pot veure a la Figura 22, a mesura que augmenta la temperatura, també augmenta la recuperació de l'1-OHPyr (el derivat hidroxilat amb major pes molecular i també més difícil d'extreure). Pel cas del 2-OHNaph, s'observa una disminució important de la recuperació a

mesura que augmenta la temperatura, probablement, com a conseqüència de la seva degradació tèrmica. Finalment, el percentatge de recuperació del 9-OHPhe és similar pels tres nivells de temperatura estudiats. Així doncs, se seleccionen els 120 °C com la temperatura més favorable per a l'extracció dels OH-PAHs del sòl mitjançant MAE.

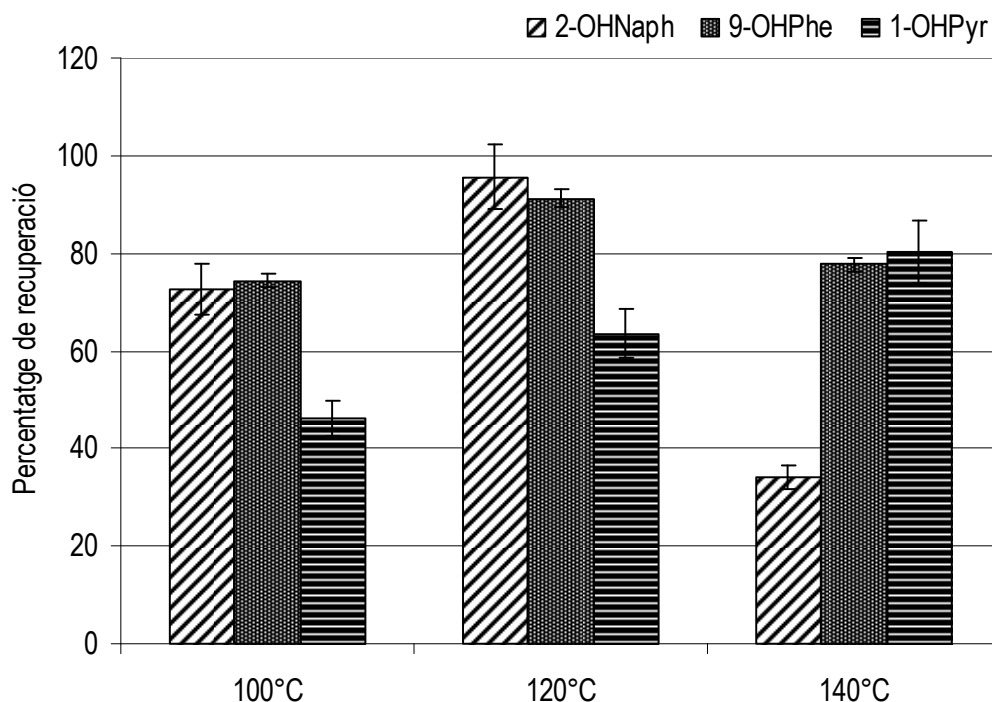


Figura 22. Percentatge de recuperació del 2-hidroxinaftalè (2-OHNaph), 9-hidroxifenantrè (9-OHPhe) i 1-hidroxipirè (1-OHPyr) en funció de tres temperatures (100 °C, 120 °C i 140 °C) mitjançant l'extracció assistida per microones. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats del procediment d'extracció (n=3)

Finalment, per estudiar la selectivitat que proporcionen els MIPs pels OH-PAHs en front dels PAHs, es dopa una mostra de sòl amb aquests dos grups de contaminants (4 OH-PAHs i 7 PAHs) i s'analitza amb la nova metodologia desenvolupada, MAE-MIPs-HPLC/FLD. Els cromatogrames obtinguts es mostren a la Figura 23. A la Figura 23a s'observa el cromatograma obtingut després del MAE optimitzat, filtració i injecció directa al cromatògraf (sense etapa de purificació). S'hi poden observar diferents pics, els quatre primers corresponents als OH-PAHs d'interès i la resta corresponents als set PAHs (només se n'observen tres d'ells ja que la programació de la fase mòbil i la programació de les longituds d'ona d'excitació/emissió per a la seva detecció no es troben optimitzades). A la Figura 23b, una mostra del mateix sòl s'extreu per MAE i se sotmet a la purificació mitjançant SPE MIPs. Com es pot veure, la selectivitat pels quatre OH-PAHs d'estudi és alta. Els PAHs no es veuen retinuts als MIPs, o bé molt poc, i només els OH-PAHs hi interaccionen favorablement i són, posteriorment, eluïts i analitzats. Finalment, la Figura 23c

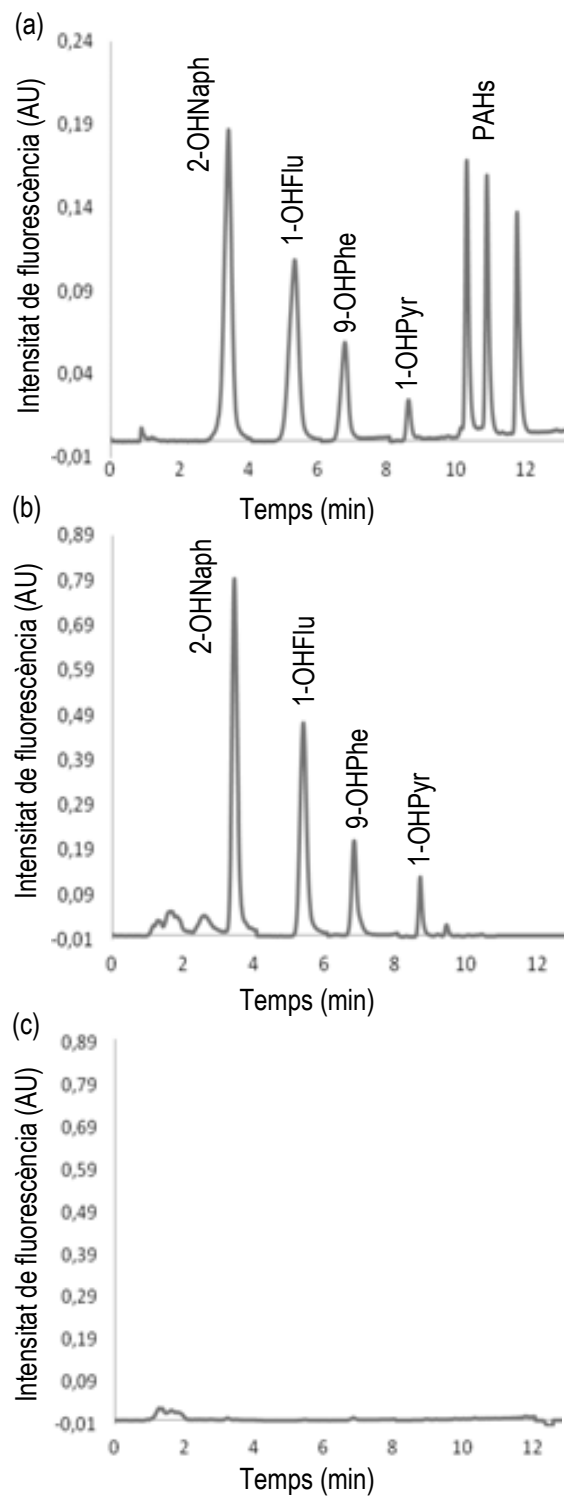


Figura 23. Cromatogrames obtinguts després de l'extracció MAE del sòl dopat (PAHs + OH-PAHs) a) sense purificació de l'extracte, b) extracte purificat per MIPs (amb un factor de concentració de 4) i c) extracte percolat a través dels NIPs

mostra els cromatogrames després de l'ús dels NIPs (els quals són el mateix polímer però sense el patró de la empremta molecular a partir d'anells de benzè hidroxilats) enlloc dels MIPs. A aquesta figura no s'observa l'aparició de pics, la qual cosa prova que no queda res retingut al cartutx de SPE i demostra que el mecanisme principal de retenció dels OH-PAHs és a través del reconeixement molecular i no a causa d'interaccions de tipus polar o de tipus dipol a la superfície del polímer. A més, durant el procés de purificació mitjançant els MIPs, es poden veure diferències importants en la intensitat de fluorescència, ja que té lloc un pas de concentració d'aproximadament quatre vegades. Cal destacar que si es necessiten menors límits de detecció (MDL) i quantificació (MQL) per la metodologia MAE-MIPs-HPLC/FLD, es pot dur a terme una etapa de concentració a través de l'evaporació del solvent després de la purificació per SPE MIPs, prèvia a l'anàlisi per HPLC/FLD.

3.2.4. COMPARACIÓ DE LA NOVA METODOLOGIA DESENVOLUPADA MAE-MIPs-HPLC/FLD AMB MAE-SILILACIÓ-GC/MS

S'avalua i es compara el comportament de la nova metodologia (MAE-MIPs-HPLC/FLD) amb la més tradicional (MAE-sililació-GC/MS) utilitzada per l'anàlisi dels OH-PAHs. Per fer-ho, s'afegeix un quart OH-PAH, el 2-OHFlu, tal i com s'ha mencionat anteriorment.

A la Taula 7 es presenten els paràmetres relacionats amb el calibratge i els percentatges de recuperació dels quatre OH-PAHs per les metodologies MAE-MIPs-HPLC/FLD i MAE-sililació-GC/MS. Els MDL i MQL ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) es calculen multiplicant els DL i QL de les tècniques instrumentals de la Taula 5 i Taula 6 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) pel volum de solvent extractant (25,00 mL), dividits pel pes de mostra (1,00000 g), corregit pels percentatges de recuperació. S'estudia també la reproductibilitat intra-laboratori (expressada com RSD) a partir de cinc mostres (dutes a terme per la mateixa persona i analitzades en dies diferents).

Comparant els avantatges i inconvenients dels dos mètodes, es pot veure a la Taula 7 que els percentatges de recuperació i la RSD són lleugerament millors mitjançant la metodologia MAE-sililació-GC/MS. Tanmateix, les recuperacions del sòl dopat amb els OH-PAHs per la nova metodologia proposada (MAE-MIPs-HPLC/FLD) oscil·len entre el 68-93 %. Altres metodologies descrites per l'anàlisi dels OH-PAHs, com ara els ultrasons o l'extracció líquid-líquid, la SPE, la SPME, seguides d'una derivatització i GC/MS (en partícules en suspensió, aigua, orines i altres

Taula 7. Paràmetres de regressió del calibrat i recuperacions dels OH-PAHs mitjançant MAE-MIPs-HPLC/FLD i MAE-sililació-GC/MS

| Metodologia Analítica | OH-PAHs | y = ax + b | | r ² | Rang estudiat (µg·mL ⁻¹) | Percentatge de recuperació (%; mitjana ± SD, n=5) | MDL (µg·g ⁻¹) | MQL (µg·g ⁻¹) | RSD (%) |
|-----------------------|----------|-------------|---------------|----------------|--------------------------------------|---|---------------------------|---------------------------|---------|
| | | a ± SD | b ± SD | | | | | | |
| MAE-sililació-GC/MS | 2-OHNaph | 0,64 ± 0,01 | - 0,02 ± 0,02 | 0,999 | 0,200-4,000 | 88 ± 3 | 0,213 | 0,703 | 4 |
| | 2-OHFlu | 0,74 ± 0,01 | - 0,04 ± 0,03 | 0,999 | 0,200-4,000 | 99 ± 3 | 0,047 | 0,155 | 3 |
| | 9-OHPhen | 0,60 ± 0,01 | - 0,06 ± 0,02 | 0,999 | 0,200-4,000 | 70 ± 1 | 0,110 | 0,363 | 2 |
| | 1-OHPyr | 0,65 ± 0,02 | - 0,07 ± 0,05 | 0,995 | 0,200-4,000 | 104 ± 6 | 0,139 | 0,459 | 6 |
| MAE-MIPs-HPLC/FLD | 2-OHNaph | 37,9 ± 0,5 | 29,9 ± 10,4 | 0,999 | 0,002-0,100 | 79 ± 5 | 0,003 | 0,010 | 7 |
| | 2-OHFlu | 24,1 ± 0,3 | 28,9 ± 14,1 | 0,998 | 0,002-0,100 | 93 ± 6 | 0,003 | 0,011 | 6 |
| | 9-OHPhen | 7,9 ± 0,1 | -8,4 ± 3,9 | 0,999 | 0,002-0,100 | 89 ± 2 | 0,007 | 0,023 | 2 |
| | 1-OHPyr | 4,5 ± 0,2 | -29,8 ± 10,4 | 0,967 | 0,002-0,100 | 68 ± 6 | 0,014 | 0,044 | 8 |

matrius biològiques) presenten recuperacions inferiors, 36-87 % [18,19,20,21,22], mentre que en sòls, mitjançant GC/FID i HPLC/DAD, es van trobar recuperacions similars [23] a nivells de dopatge equivalents o superiors. Per altra banda, els valors de RSD trobats a la bibliografia per l'anàlisi d'OH-PAHs en sòls i sediments són similars (3-11 %) [24] o superiors (9-41 %) [18] que els obtinguts per MAE-MIPs-HPLC/FLD (2-8 %).

Els MDL i MQL són d'un ordre de magnitud inferiors pel mètode MAE-MIPs-HPLC/FLD, en comparació al MAE-sililació-GC/MS. Els MDL del nou mètode proposat oscil·len entre 0,003-0,014 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, els quals són valors comparables a altres metodologies publicades per l'anàlisi d'OH-PAHs en sòls (0,420 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ pel 2-OHNaph [23] i 0,1-0,3 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ per a 3 OH-PAHs [18]).

També és interessant tenir en compte que el temps necessari per l'anàlisi d'una mostra és més curt pel cas del MAE-MIPs-HPLC/FLD. En aquest cas, la purificació mitjançant SPE MIPs requereix 10 min per mostra i es podria reduir si s'utilitzés un col·lector múltiple de buit per fer la purificació de totes les mostres alhora. Per altra banda, l'etapa de sililació del mètode MAE-sililació-GC/MS requereix, com a mínim, 30 min. Els OH-PAHs, generalment, es veuen convertits en els seus derivats sililats en menys d'una hora a 60 °C en reaccionar amb BSTFA. Es van avaluar tres temps de derivatització amb BSTFA: 30, 45 i 60 min, i es va arribar en tots els casos a resultats equivalents. Així doncs, es va mantenir el temps de reacció a 30 min sense canvis significatius en la quantificació dels quatre OH-PAHs d'interès. De totes maneres, aquesta etapa de derivatització és un procés llarg. A més, la separació i anàlisi cromatogràfica per HPLC/FLD es pot dur a terme en 10 min, mentre que per GC/MS es necessiten 25 min per completar-la.

Amb relació a les interferències, els cromatogrames obtinguts per la metodologia MAE-MIPs-HPLC/FLD són més nets, és a dir, mostren l'aparició de menys interferències gràcies a l'utilització de la SPE MIPs com a mètode selectiu de purificació. En canvi, la presència d'interferències és major pel mètode de MAE-sililació-GC/MS, ja que no es va dur a terme cap etapa de purificació. A més, alguns autors han observat interferències dels àcids húmics i fúlvics (coextrets del sòl) amb el procés de derivatització dels analits d'interès [18], fet que s'evita amb la metodologia MAE-MIPs-HPLC/FLD.

Finalment, en termes de consum de solvent, la metodologia més adequada és la MAE-sililació-GC/MS. Tot i que la quantitat de solvent consumit és petita durant el MAE, les diferències entre

les dues metodologies s'accentuen en l'etapa de purificació i anàlisi per MAE-MIPs-HPLC/FLD, ja que la SPE MIPs i HPLC/FLD requereixen l'ús de majors volums de solvents orgànics.

3.2.5. APLICACIÓ A ESTUDIS DE BIODEGRADACIÓ

Per a l'aplicació de la metodologia a l'anàlisi d'OH-PAHs en estudis de biodegradació, es preparen dos microcosmos a partir de mostres de sòl recollides a Yvetot, segons el procediment descrit a l'apartat experimental (secció 2.10.1). El primer microcosmos, anomenat E1, conté una concentració de Phe de 3000 mg·kg⁻¹, i el segon microcosmos, anomenat E2, conté una mescla de 7 PAHs (Phe, Fluo, Pyr, BaP, BbF, BkF, B(g,h,i)P) que sumen un total de 300 mg·kg⁻¹. Abans del començament de les anàlisis dels microcosmos, es procedeix a l'anàlisi d'un blanc per controlar la contaminació de fons, la qual es comprova que no excedeix els 0,600 mg·kg⁻¹ del total dels 16 PAHs definits per la US EPA. Per l'anàlisi dels microcosmos s'apliquen les dues metodologies descrites anteriorment, les quals es troben esquematitzades a la Figura 24.

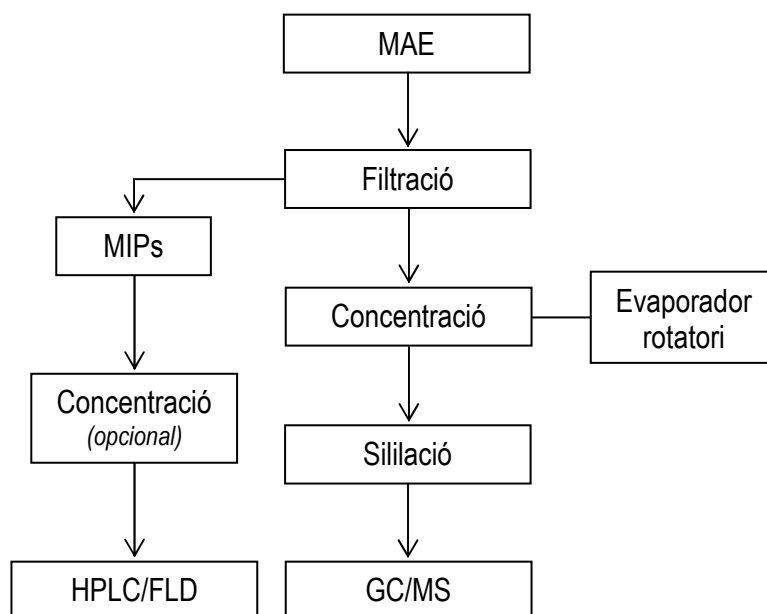


Figura 24. Esquema de les metodologies per l'anàlisi dels OH-PAHs

3.2.5.1. 9-HIDROXIFENANTRÈ AL MICROCOSMOS E1

Els OH-PAHs són metabòlits que apareixen generalment a les primeres etapes del procés de degradació dels PAHs per microorganismes, i poden ser convertits ràpidament a metabòlits oxigenats. L'anàlisi del microcosmos E1 es porta a terme després de 7 dies d'incubació. Pel

MAE-MIPs-HPLC/FLD, es troba una concentració de 9-OHPhe de $2,50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a l'extracte del MAE, la qual cosa correspon a $63 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ al sòl. Aquest valor indica que els metabòlits hidroxilats es poden trobar a nivells traça en sòls i, per tant, són necessàries metodologies analítiques eficients per quantificar-los. A la Figura 25 es mostra un cromatograma amb tres pics principals entre els minuts 6 i 8, un d'ells assignat al 9-OHPhe (identificat per comparació amb el temps de retenció del patró), i dos altres pics que possiblement corresponen a d'altres metabòlits hidroxilats dels PAHs.

Es pot observar a la Figura 25 que també es detecta part del Phe nadiu tot i utilitzar l'etapa de purificació selectiva mitjançant la SPE MIPs. De fet, és conegut a través del fabricant que durant el procés de purificació amb els MIPs s'extreu menys de l'1% dels PAHs degut a interaccions no selectives de caràcter hidrofòbic a la superfície del polímer impremtat. De totes maneres, es pot dir que el Phe que ha quedat retingut als MIPs és tant sols residual, ja que cal tenir en compte que la concentració inicial d'aquest al microcosmos és de $3000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

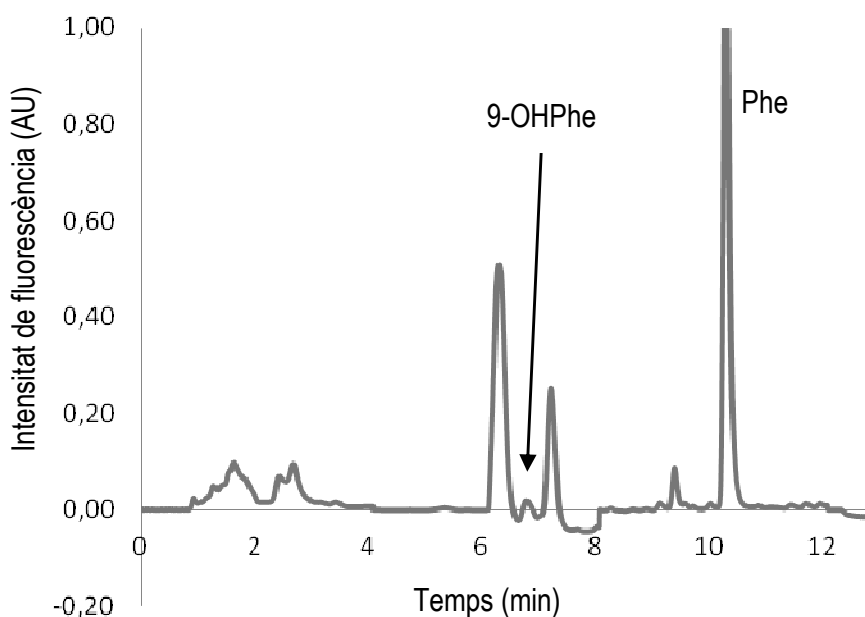


Figura 25. Cromatograma del microcosmos E1 seguint la metodologia MAE-MIPs-HPLC/FLD

Per altra banda, a la Figura 26 s'observa el cromatograma obtingut després d'aplicar la metodologia MAE-sililació-GC/MS. Es pot veure l'aparició de múltiples pics, alguns d'ells corresponents a derivats hidroxilats, incloent el 9-OHPhe (indicat) i d'altres a residus de la sililació o interferències provinents de la matriu del sòl. Tanmateix, la concentració del 9-OHPhe es troba per sota del límit de quantificació la metodologia.

Es torna a analitzar el microcosmos E1 després de 21 dies d'incubació seguint la metodologia MAE-MIPs-HPLC/FLD i s'observa una concentració de 9-OHPhe de $5,60 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a l'extracte del MAE, la qual cosa correspon a $140 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ al sòl. Per tant, el Phe es troba encara en procés de degradació pels microorganismes presents al sòl després de 3 setmanes d'incubació. Per MAE-sililació-GC/MS no es pot quantificar el 9-OHPhe, igual que en l'anàlisi anterior al cap de 7 dies d'incubació, ja que es troba per sota del QL.

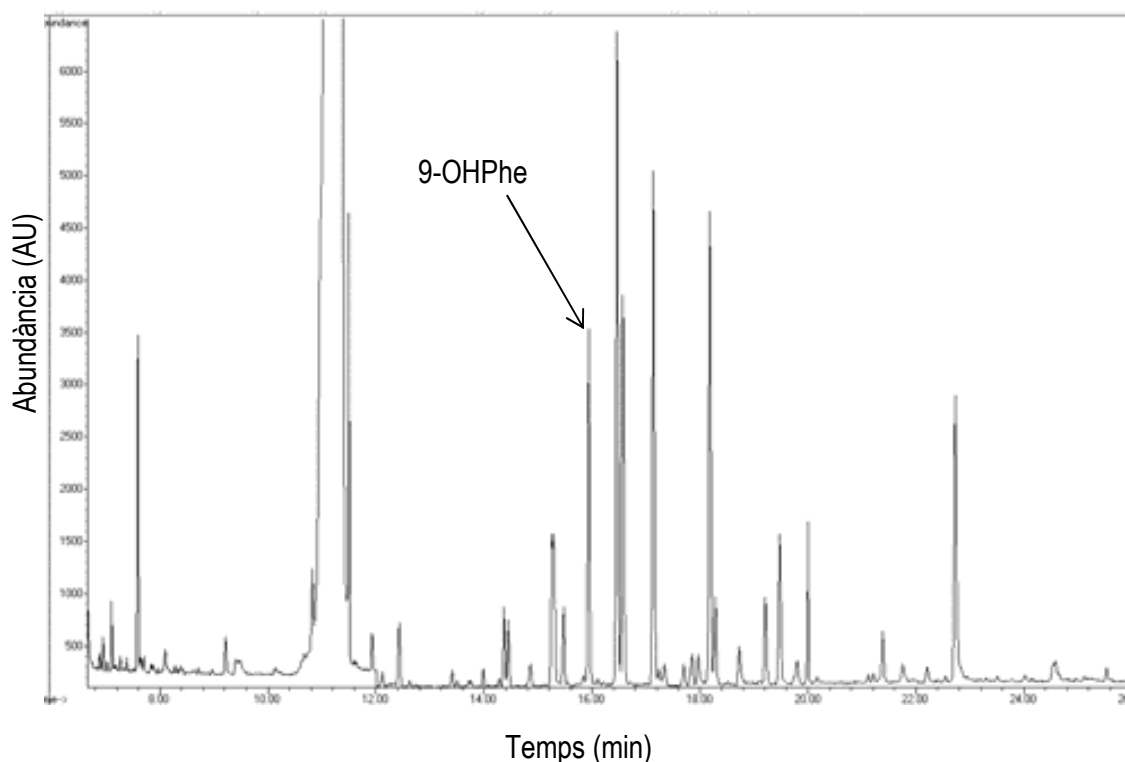


Figura 26. Cromatograma corresponent a l'anàlisi del microcosmos E1 mitjançant la metodologia MAE-sililació-GC/MS

Les dues metodologies demostren ser útils per a la detecció dels derivats monohidroxilats dels PAHs d'interès, però només la MAE-MIPs-HPLC/FLD permet aportar resultats quantitatius pel 9-OHPhe.

3.2.5.2. METABÒLITS HIDROXILATS AL MICROCOSMOS E2

Anàlogament al microcosmos E1, l'anàlisi del microcosmos E2 (Figura 27) es porta a terme al cap d'una setmana d'incubació per seguir l'aparició dels OH-PAHs seleccionats (arran de la degradació dels PAHs afegits al sòl). Quan s'aplica la metodologia MAE-MIPs-HPLC/FLD s'observa el 9-OHPhe, el qual es troba a una concentració de $6,00 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a l'extracte del MAE, la

qual cosa correspon a $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ al sòl. Per altra banda, també es poden veure tres pics a la zona on apareix l'1-OHPyr. En aquest cas, la comparació del cromatograma del patró pur amb el cromatograma obtingut de l'anàlisi del microcosmos no és suficient per identificar l'1-OHPyr de forma fiable (es podria dopar la mostra amb aquest compost i observar si s'aprecia un increment d'algun dels pics i/o analitzar-ho amb un espectròmetre de masses). El 2-OHNaph i el 2-OHFlu no es detecten ja que els PAHs corresponents (Naph i Flu) no es troben presents a la mescla que s'utilitza per dopar els microcosmos. La concentració del 9-OHPhe és dues vegades superior al microcosmos E2 que al microcosmos E1, tot i que la concentració de Phe afegida a l'E1 és 70 vegades major. Es pot pensar que l'alt nivell de concentració de contaminació introduïda al primer microcosmos pot influir un efecte tòxic sobre els microorganismes, els quals són els responsables de la degradació dels PAHs, cosa que provoca que la degradació del Phe sigui menor. Està descrit a la bibliografia que una alta dosi de PAHs introduïda a un substrat pot afectar a l'activitat del procés de degradació pels microorganismes. Verrhiest *et al.* (2002) van establir que una dosi de PAHs no provoca cap efecte sobre la comunitat microbiana fins a una concentració de $30 \text{ mg PAH}\cdot\text{kg}^{-1}$ però, a majors concentracions, es pot donar una inhibició parcial de l'activitat enzimàtica [25].

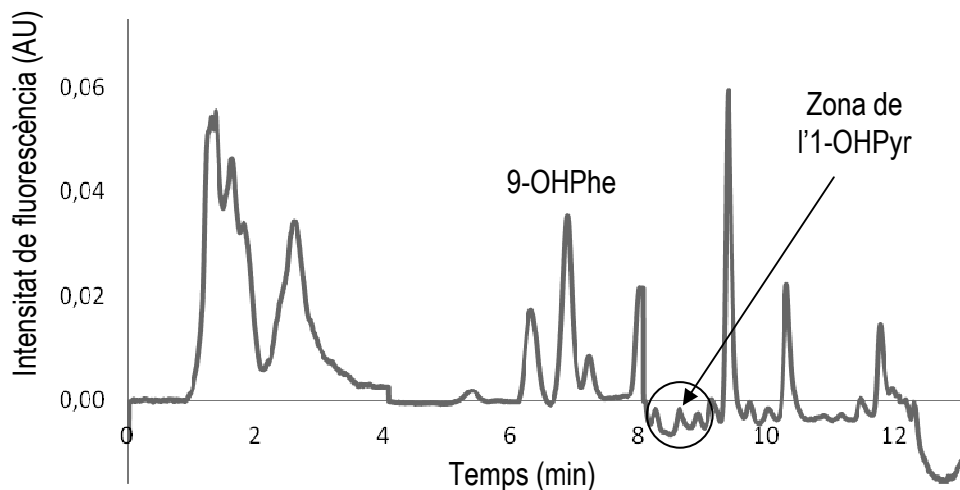


Figura 27. Cromatograma corresponent a l'anàlisi del microcosmos E2 mitjançant la metodologia MAE-MIPs-HPLC/FLD

Tanmateix, la manera com els microorganismes degraden els PAHs en aigües, sòls o sediments depèn de l'adaptació microbiana com a resposta a l'exposició perllongada als PAHs i l'impacte que produeix aquesta exposició encara es troba per determinar [26]. Després de 21 dies d'incubació del microcosmos E2, es troba una concentració de 9-OHPhe, seguint la metodologia MAE-MIPs-HPLC/FLD, de $7,10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ a l'extracte del MAE, la qual cosa correspon a $178 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ al

sòl. Per MAE-sililació-GC/MS, només es pot arribar a detectar el 9-OHPhe d'entre tots els pics interferents, però no quantificar-lo, tal i com succeïa pel cas del microcosmos E1.

3.3. CARACTERITZACIÓ DE LES MOSTRES

A la Taula 8 es presenten els resultats de la caracterització de les mostres de Polinyà, Sabadell, Sant Quirze i Terrassa seguint els procediments descrits a l'apartat experimental (secció 2.8)

Es pot comprovar que la humitat dels sòls és molt baixa, particularment pels de Polinyà i Sabadell, segurament a causa de que la mostra que es pren és poc profunda (0-20 cm) i els sòls es troben exposats directament a la llum solar, ja que la vegetació que es troba al voltant no arriba a cobrir la zona de presa de mostra. Per altra banda, els sòls de Sant Quirze i Terrassa foren recollits al voral de l'autopista, zones cobertes amb pins i matollars, no exposada directament a la llum solar. La determinació de la humitat del sòl és un paràmetre important a tenir en compte ja que influeix en el desenvolupament de la vida dels éssers vius i afecta a la disponibilitat i mobilitat de les espècies químiques presents al sòl. Els PAHs, per exemple, són molt poc solubles en aigua, de manera que només una petita fracció d'aquests es troba dissolta en l'aigua del sòl. Aquest fet pot constituir un inconvenient important en tasques de bioremediació *in situ* d'aquests compostos del sòl ja que, la degradació dels més insolubles pot veure's inhibida per la baixa transferència de massa dels PAHs a les cèl·lules bacterianes trobant-se, per tant, poc biodisponibles [16,27].

Pel que fa al pH, els quatre sòls presenten valors molt similars entre ells, en un rang de 7,77-8,34, la qual cosa permet classificar-los com a moderadament bàsics. Aquests valors també indiquen que són sòls amb un cert percentatge de carbonats. Generalment, el rang de carbonats sol variar entre el 2-40 % i, pels quatre casos, s'observen valors que es poden considerar moderats, entre el 6-11 %. Això significa que són sòls que es troben ben estructurats (en funció de la forma i concentració dels carbonats) cosa que pot comportar limitacions en el moment en què els carbonats formen una capa impermeable que redueix la disponibilitat de nutrients i condueix a una disminució de la capacitat de retenció d'aigua (MWHC) del sòl [28]. A nivell biològic s'ha detectat que tant el pH com el percentatge de carbonats poden tenir una influència important en els processos metabòlics dels microorganismes del sòl. Pawar (2012) va observar que la gran majoria d'espècies de bacteris degradadores dels PAHs desenvolupen el seu metabolisme de manera òptima a un pH de 7,5. En aquest estudi va comprovar que alguns PAHs de 2 a 4 anells

de benzè arribaven a degradar-se un 50 % al cap de 3 dies i que el creixement bacterià i l'activitat enzimàtica present al sòl era també major [29]. En la mateixa línia, Kazeev *et al.* (2012) van observar que la presència de carbonats també pot intensificar l'activitat biològica del medi [30].

Taula 8. Paràmetres de caracterització de les mostres

| | Polinyà | Sabadell | Sant Quirze | Terrassa |
|--|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Humitat^a (%) | 1,3 ± 0,2 | 1,9 ± 0,2 | 6,8 ± 0,1 | 9,4 ± 0,5 |
| pH^a | 7,88 ± 0,04 | 7,77 ± 0,07 | 8,14 ± 0,03 | 8,34 ± 0,05 |
| Carbonats^a (%) | 6 ± 1 | 6 ± 1 | 8 ± 1 | 11 ± 1 |
| Matèria orgànica^a (%) | 1,0 ± 0,3 | 0,9 ± 0,2 | 1,5 ± 0,2 | 1,2 ± 0,3 |
| Carboni orgànic^a (%) | 0,6 ± 0,2 | 0,5 ± 0,1 | 0,9 ± 0,1 | 0,7 ± 0,2 |
| Conductivitat elèctrica^a ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) | 190 ± 25 | 194 ± 7 | 78 ± 6 | 69 ± 4 |
| Capacitat màxima de retenció d'aigua^a (%) | 27 ± 2 | 32 ± 1 | 40 ± 1 | 32 ± 2 |
| Unitats formadores de colònies^c (CFU·g⁻¹) (10⁻³) | 7,6 ± 1,0 | 1,5 ± 0,4 | 8,0 ± 0,7 | 6,0 ± 1,5 |

n.d. No determinat, ^a mitjana ± CI₉₅ %, n=5, ^b mitjana ± CI₉₅ %, n=3, ^c mitjana ± CI₉₅ %, n=2 (correspon al sumatori dels metalls d'interès: Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Pb)

La quantitat de matèria orgànica (OM), generalment expressada com a percentatge de carboni orgànic (OC), acostuma a oscil·lar entre el 1,0 i el 6,0 % a la part superior del sòl (0-30 cm) pel 74 % dels sòls d'Europa [31]. Els sòls que es troben per sota de l'1,0 % es consideren molt baixos en OC (i, per tant, molt baixos en OM), i per sobre del 6,0 % es consideren alts. Els sòls de la comarca del Vallès Occidental presenten un percentatge d'OC inferior a l'1,0 %. Aquest poc contingut en OC indica que la capacitat de retenció dels contaminants a aquests sòls serà bastant reduïda, ja que l'adsorció de compostos orgànics i quelats es deu, principalment, a la presència de matèria orgànica, concretament de substàncies húmiques que tenen un alt poder aglomerant. Per altra banda, l'augment de la quantitat d'OC potencia la capacitat de retenció d'aigua dels sòls (MWHC) que, en aquests casos, es pot observar que és molt similar per tots ells.

Quant a la conductivitat elèctrica de l'aigua del sòl (EC), es determinen valors entre 69-174 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, tots ells inferiors a 4000 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$, valor per sota del qual el sòl es considera no salí [32]. La salinitat pot afavorir les reaccions de complexació amb metalls com a conseqüència de la presència d'ions com el Cl^- , la qual cosa facilita la solubilització dels metalls i, per tant, la seva biodisponibilitat per part dels microorganismes presents al sòl. Per tant, pels sòls d'estudi, poc salins, aquesta dada permet preveure que la biodisponibilitat dels contaminants serà baixa.

El nombre d'unitats formadores de colònies (CFU), el qual representa un valor indicatiu del nombre de microorganismes presents per gram de sòl, és major pel sòl de Sabadell, i pot jugar un paper molt important en el percentatge de degradació de compostos orgànics que es doni en aquest.

Per últim, a la Taula 9 es pot veure que cap dels PAHs analitzats als diferents sòls de la comarca del Vallès Occidental superen, els límits establerts pel Reial Decret 9/2005, del 14 de gener, sobre els criteris per la declaració de sòls contaminats [3], ni de forma individual ni com a sumatori de tots ells. Els dos sòls més contaminats són els de Sabadell i Sant Quirze, superant en 4-5 vegades la concentració de PAHs trobada als de Polinyà i Terrassa.

Taula 9. Concentració de PAHs als quatre sòls analitzats per MAE-GC/MS ^a

| | Polinyà ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) | Sabadell ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) | Sant Quirze ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) | Terrassa ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) | Valor límit de PAHs en sòls per a ús urbà ($\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) segons la legislació vigent [33] |
|-------------|---|--|---|--|--|
| Phe | 15 ± 2 | 38 ± 1 | 57 ± 5 | 15 ± 3 | - |
| Fluo | 10 ± 3 | 71 ± 11 | 46 ± 2 | 11 ± 3 | 80000 |
| Pyr | 6 ± 1 | 54 ± 4 | 48 ± 1 | 8 ± 1 | 60000 |
| BbF | 11 ± 2 | 67 ± 1 | 57 ± 5 | 8 ± 1 | 2000 |
| BaP | 6 ± 1 | 34 ± 3 | 46 ± 3 | 24 ± 8 | 200 |
| ΣPAH | 48 ± 4 | 264 ± 12 | 254 ± 8 | 66 ± 9 | 142200 |

^a mitjana ± CI_{95%}, n=3

Per altra banda, a la Taula 10 es pot observar que els metalls pesants analitzats (Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Pb), no superen en cap cas, ni a nivell individual ni com a sumatori de tots ells, la concentració màxima permesa als sòls amb pH superior a 7, segons la legislació sobre metalls pesants en sòls, fangs i substrats del Reial Decret 1310/1990 i la seva actualització del 2010

recollida al B.O.E als números 262 de l'1 de novembre del 1990 i el número 170 del 2 de juliol de 2010, respectivament [34,35]. També es pot observar que la concentració total de metalls pesants als diferents sòls és del mateix ordre per tots els casos i que el Mn és el que es troba en major quantitat, seguit del Zn. Per altra banda, el contingut de metalls biodisponible pel sòl de Sant Quirze és quasi 20 vegades superior al de Sabadell (recollit a l'anterior Taula 8).

Taula 10. Concentració de metalls pesants als quatre sòls analitzats per FP-XRF ^a

| | Polinyà (mg·kg ⁻¹) | Sabadell (mg·kg ⁻¹) | Sant Quirze (mg·kg ⁻¹) | Terrassa (mg·kg ⁻¹) | Valor límit de HM per sòls amb pH > 7,0 (mg·kg ⁻¹) segons la legislació vigent [36] |
|------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|--|
| Cr | < DL | < DL | < DL | < DL | 150,0 |
| Mn | 414 ± 18 | 427 ± 29 | 335 ± 2 | 450 ± 17 | - |
| Co | 35 ± 3 | 31 ± 2 | 28 ± 2 | 43 ± 10 | - |
| Ni | < DL | < DL | < DL | < DL | 112,0 |
| Cu | < DL | 60 ± 2 | 48 ± 10 | 26 ± 7 | 210,0 |
| Zn | 89 ± 1 | 137 ± 10 | 7 ± 1 | 107 ± 4 | 450,0 |
| Cd | < DL | < DL | < DL | < DL | 3,0 |
| Hg | < DL | < DL | < DL | < DL | 1,5 |
| Pb | 26 ± 2 | 39 ± 8 | 159 ± 9 | 37 ± 3 | 300,0 |
| ΣHM | 564 ± 18 | 694 ± 32 | 577 ± 14 | 663 ± 22 | 1226,5 |

^a mitjana ± CI₉₅ %, n=3

3.4. INFLUÈNCIA DELS METALLS PESANTS (HM) EN LA DEGRADACIÓ DELS HIDROCARBURS AROMÀTICS POLICÍCLICS (PAHs)

En aquesta secció es presenten els resultats associats a l'anàlisi d'una sèrie de microcosmos preparats amb l'ànim d'estudiar la influència de diferents concentracions de metalls pesants (HM) en la degradació dels PAHs en sòls al llarg de dos mesos.

El sòls són un tipus de matriu molt complexa, amb característiques físicoquímiques diferents a la qual s'hi troben molts tipus de contaminants (HM, excés de nutrients, compostos orgànics com els PAHs o els bifenils policlorats (PCBs), etc.) com a resultat de la descomposició natural i d'emissions antropogèniques, i múltiple varietat de microorganismes, vegetació i animals [37,38]. Per tant, l'avaluació de l'impacte sobre la biodiversitat i la quimiodiversitat, així com les

conseqüències sobre els ecosistemes com a resultat de la interacció entre els diferents contaminants i els éssers vius és clarament d'interès des del punt de vista de la investigació. L'estudi de l'efecte de les mescles de contaminants també pot aportar informació rellevant per a l'avaluació potencials tasques de bioremediació com a eines per eliminar o reduir la contaminació en certes matrius ambientals.

En aquesta secció de la tesi doctoral, els objectius específics són l'estudi de l'efecte de les mescles de contaminants. En particular, l'estudi se centra en la interacció entre grups de contaminants inorgànics (HM) i orgànics (PAHs). Es vol identificar quina és la influència de la presència de diferents concentracions de HM en la degradació dels PAHs pels microorganismes presents al sòl (principalment comunitats bacterianes). Tal i com es repassa a la introducció (secció 1.5), hi ha diversos estudis tant dels efectes dels HM sobre l'activitat dels microorganismes com de la degradació dels PAHs, però la quantitat d'informació en presència de les mescles d'aquests contaminants és escassa.

En aquest estudi es preparen i s'analitzen, al llarg de tres mesos, una sèrie de microcosmos dissenyats per seguir la degradació dels PAHs a diferents concentracions de HM. Els microcosmos, preparats mitjançant l'addició de PAHs i HM en una quantitat de sòl concreta (apartat experimental, secció 2.10.3), representen una reproducció del medi ambient a escala de laboratori. Per a la preparació dels microcosmos es desenvolupa una estratègia detallada per tal d'introduir els contaminants al sòl i minimitzar l'alteració de les característiques fisicoquímiques i biològiques de la mostra, tractant-se doncs d'una tasca laboriosa. Per començar i abans d'entrar de ple amb l'objectiu principal sobre l'efecte dels contaminants mesclats, cal seleccionar el sòl d'estudi i establir els criteris de dopatge dels PAHs i HM. Un dels paràmetres que es tenen en compte per la selecció del sòl d'estudi és la diferent capacitat de degradació dels PAHs per part dels microorganismes presents als sòls. Per aquest motiu, primer cal establir el criteri de dopatge dels PAHs i així avaluar la seva degradació als sòls (sense HM) i, juntament amb la caracterització de la mostra duta a terme anteriorment (secció 3.3), se selecciona el sòl d'estudi. Finalment, un cop triat el sòl d'estudi, s'estableix el nivell de dopatge dels HM (a partir d'una sèrie d'assajos microbiològics) i es porten a terme els estudis de degradació amb la mecla dels dos tipus de contaminants.

3.4.1. SELECCIÓ DEL NIVELL DE DOPATGE DELS PAHs

Els estudis de degradació es porten a terme amb 5 PAHs representatius. El Phe (3 anells benzènics), Fluo (4 anells en total: 3 anells benzènics i un ciclopentà), el Pyr (4 anells benzènics), el BbF (5 anells en total: 4 anells benzènics i un ciclopentà) i el BaP (5 anells benzènics i principal referent de contaminació en sòls a causa de la seva elevada toxicitat). Es considera estudiar els mateixos PAHs utilitzats en la validació de la metodologia per l'anàlisi dels PAHs (apartat 3.1), substituint el BaA i el Chry pel BaP. El BaP s'introdueix ja que és el PAH més utilitzat com a referent de toxicitat a causa del seu elevat potencial carcinogen. A més, a altes concentracions, el BaA i el Chry mostren molt baixa resolució. Per altra banda, es mantenen els altres quatre PAHs (Phe, Fluo, Pyr i BbF) utilitzats en la validació de la metodologia analítica.

Els PAHs, generalment, es troben a baixes concentracions al sòl, la qual cosa dificulta la seva determinació i, per tant, complica les anàlisis i els estudis sobre la seva degradació. Per això, en treballs d'investigació involucrats en la preparació de microcosmos, és habitual introduir al sòl una quantitat de PAHs entre 100 i 10000 vegades la concentració total d'aquests trobada a la mostra de sòl original [39]. En aquest cas, els estudis preliminars de degradació per la selecció del sòl de treball es porten a terme amb els sòls de Sant Quirze, Polinyà i Sabadell, els quals presenten, una concentració total com a resultat de la suma dels 5 PAHs (Phe, Fluo, Pyr, BbF i BaP) de 254 ± 8 , 48 ± 4 i 264 ± 12 , respectivament. Per aquest motiu es decideix dopar tots els sòls per arribar a una concentració total dels 5 PAHs de $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, és a dir, $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de cadascun dels PAHs (la qual cosa correspon a 390 vegades la concentració natural del sòl de Sant Quirze, 2100 vegades la de Polinyà i 390 vegades la de Sabadell).

3.4.2. SELECCIÓ DEL SÒL DE TREBALL

Un cop establert el nivell de dopatge dels PAHs es procedeix a la selecció del sòl de treball. Per fer-ho es porta a terme un estudi preliminar de degradació amb tres sòls representatius, Sant Quirze, Polinyà i Sabadell. Amb aquests sòls es preparen microcosmos només dopats amb PAHs (sense metalls), tal i com s'indica a l'apartat experimental (secció 2.10.2) i s'analitza a temps inicial (0 dies) i al cap d'un mes. Això es fa amb l'objectiu de determinar en quin dels sòls la degradació és major i així seleccionar, juntament amb les dades de caracterització de mostra, el sòl més adequat per l'avaluació de l'efecte dels HM en la degradació dels PAHs.

A la Taula 11 es mostren els percentatges de degradació al cap d'un mes de l'anàlisi dels microcosmos. Es pot observar que als sòls de Sant Quirze i Sabadell són als quals té lloc una major degradació dels PAHs. Els PAHs més lleugers, de 3 i 4 anells (Phe, Fluo i Pyr), es degraden més al sòl de Sabadell (97, 95 i 91 %, respectivament), mentre que els més pesants, de 5 anells (BbF i BaP), ho fan al sòl de Sant Quirze (51 i 40 %, respectivament). Al sòl de Polinyà, el PAH que es degrada més és el Fluo (50 %), i els altres es troben entre el 22-44 %. Tenint en compte aquestes observacions, les dades de la caracterització de les mostres, i dels resultats de la col·laboració amb l'Institut d'Investigació Tèxtil i Cooperació Industrial de Terrassa (INTEXTER) per a la determinació del nombre de comunitats bacterianes dels sòls d'estudi, el sòl seleccionat per avaluar la degradació dels PAHs en presència de metalls és el de Sabadell. Tot i que al de Sant Quirze s'observa major degradació pels PAHs de pes molecular més elevat, el sòl de Sabadell posseeix una quantitat de colònies bacterianes ($1,5 \cdot 10^4$ CFU·g⁻¹) superior al de Sant Quirze ($8,6 \cdot 10^3$ CFU·g⁻¹). Per altra banda, el sòl de Sabadell és més sec que el de Sant Quirze, i ja s'ha mencionat que la humitat representa un factor limitant durant la desorció dels PAHs del sòl a causa de la seva hidrofobicitat, fet que limita la biodisponibilitat d'aquests pels microorganismes [40]. Per últim, el sòl de Sabadell no es troba a una zona sotmesa a obres ni reestructuracions per edificació o per la construcció de carreteres, sinó que ha estat estable al llarg de 20 anys. En canvi, el de Sant Quirze s'ha trobat subjecte a variacions a causa d'obres de manteniment de l'autopista C-58 (enderroc del pont sobre la C-58 de l'antiga BV-1414, l'agost de 2011; obres de manteniment entre el km 18 i km 17 Sant Quirze-Terrassa, en sentit nord, el maig de 2013) i el projecte constructiu aprovat el 2009 de la millora general de les autopistes C-58 i C-16 en el tram de Badia del Vallès-Sant Quirze del Vallès-Terrassa (*Acondicionamiento y ampliación a tres carriles y calzadas laterales*)[‡].

Taula 11. Percentatge de degradació dels PAHs al cap d'un mes als diferents sòls

| | Phe | Fluo | Pyr | BbF | BaP |
|--------------------|-----|------|-----|-----|-----|
| Sant Quirze | 96 | 89 | 85 | 51 | 40 |
| Polinyà | 22 | 50 | 44 | 23 | 42 |
| Sabadell | 97 | 95 | 91 | 26 | 16 |

[‡] Informació facilitada per l'actual arquitecte municipal de l'Ajuntament de Sant Quirze del Vallès

3.4.3. SELECCIÓ DEL NIVELL DE DOPATGE DELS HM

Un cop seleccionat el sòl de treball i establert el criteri de dopatge dels PAHs, cal definir la concentració a la qual s'introduirà l'altre tipus de contaminant, els HM. La selecció dels metalls d'estudi es fa a partir d'una primera anàlisi d'escombratge mitjançant ICP/MS de la concentració total present al sòl. A partir d'aquí, se seleccionen aquells que es troben a major concentració i per sobre dels límits de quantificació: Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn i Pb.

Per introduir els HM al sòl s'ha seguit una estratègia concreta per tal de minimitzar l'efecte tòxic que poden tenir sobre els microorganismes, ja que podrien resultar letals per aquests (la toxicitat d'un element és la capacitat que té aquest material de produir un efecte advers a alguna funció biològica). Els contaminants es poden des-adsorbir del sòl per diferents processos (volatilització, dissolució, lixiviació o erosió), i poden ser assimilats pels microorganismes, cosa que normalment succeeix quan es troben en les formes més solubles [41]. La possibilitat que un element quedi lliure i es dissolgui és el que s'anomena disponibilitat. La biodisponibilitat és, doncs, el grau de llibertat d'un element o compost per ser capturat per un organisme (ingerit o adsorbit) i, normalment, només representa una petita fracció del contingut total present en la matriu en què es troba [42]. Per aquest motiu, cal diferenciar entre la contaminació en metalls total al sòl i la concentració biodisponible, que és aquella que es troba a l'abast dels microorganismes i s'utilitzarà per adoptar els criteris per a dur a terme el dopatge i estudis de metalls.

A la Taula 12 es mostren els resultats de les anàlisis de les fraccions total, hidrosoluble i intercanviable en la mostra de sòl de Sabadell. Es pot veure, de manera aproximada, que la fracció hidrosoluble representa aproximadament el 0,03 % del contingut total de metalls mentre que la intercanviable representa el 0,2 % (càlcul aproximat tenint en compte que la quantificació de la fracció total i la biodisponible s'han dut a terme amb tècniques instrumentals diferents (com s'indica a l'apartat experimental, secció 2.8.7). També es pot comprovar que el Zn i el Mn són els dos elements que es troben a major concentració a la fracció intercanviable, seguits del Cu, Cr i Pb i, finalment el Ni i Co. De fet, és acceptat que l'ús del $MgCl_2$ en extraccions simples pot constituir un mètode ràpid prou acurat per estimar el contingut biodisponible de metalls al sòl [43], de manera que, en aquest estudi, s'utilitzarà l'anàlisi de la fracció intercanviable amb aquest objectiu.

Així doncs, l'ordre de més a menys concentració de contaminant en forma biodisponible (a partir de l'anàlisi de la fracció intercanviable) és $Zn = Mn > Cu > Cr \sim Pb > Ni > Co$. Tant pels estudis microbiològics que s'exposen a continuació (secció 3.4.3.1) com per l'estudi de la degradació dels PAHs a diferents concentracions de metalls (secció 3.4), es manté la proporció d'aquests contaminants al sòl, tal i com es descriu a l'apartat experimental (secció 2.9.2 i 2.10.3), respectivament.

Taula 12. Concentració de les diferents fraccions de metalls trobades al sòl de Sabadell

| | Fracció total^a (mg·kg⁻¹) | Fracció hidrosoluble^b (mg·kg⁻¹) | Fracció intercanviable (biodisponible)^b (mg·kg⁻¹) |
|------------|---|--|--|
| Cr | < DL | 0,006 ± 0,003 | 0,15 ± 0,01 |
| Mn | 427 ± 29 | 0,049 ± 0,005 | 0,45 ± 0,05 |
| Co | 31 ± 2 | 0,0008 ± 0,0006 | 0,011 ± 0,001 |
| Ni | < DL | 0,012 ± 0,003 | 0,049 ± 0,009 |
| Cu | 60 ± 2 | 0,088 ± 0,005 | 0,17 ± 0,03 |
| Zn | 137 ± 10 | 0,023 ± 0,005 | 0,48 ± 0,07 |
| Pb | 39 ± 8 | 0,0018 ± 0,0003 | 0,153 ± 0,003 |
| ΣHM | 694 ± 32 | 0,18 ± 0,08 | 1,46 ± 0,09 |

^aConcentració determinada mitjançant la tècnica instrumental FP-XRF (mitjana ± CI₉₅ %, n=3) ^bConcentració determinada mitjançant la tècnica instrumental ICP-MS (mitjana ± CI₉₅ %, n=3).

Per decidir els nivells de metalls a introduir als microcosmos per l'avaluació de la seva influència en la degradació dels PAHs, es porten a terme una sèrie d'estudis microbiològics per comprovar l'efecte tòxic de tal contaminació sobre les comunitats bacterianes.

3.4.3.1. ESTUDI MICROBIOLÒGIC A DIFERENTS CONCENTRACIONS DE METALLS PESANTS

Aquests estudis es realitzen als laboratoris de l'Institut d'Investigació Tèxtil i Cooperació Industrial de Terrassa (INTEXTER).

Es procedeix al dopatge del sòl d'estudi a diferents concentracions de HM, en un interval de concentracions que avarca des de la concentració biodisponible trobada al sòl (sense dopar), fins a 1000 vegades la concentració biodisponible. Així doncs, es dopa amb el doble (x2), cinc vegades (x5), deu vegades (x10), cinquanta vegades (x50), cent vegades (x100), dues-centes cinquanta vegades (x250), cinc-centes vegades (x500) i mil vegades (x1000), tal i com s'explica a l'apartat experimental 8secció 2.9.2). El límit inferior queda, doncs, fixat per la concentració biodisponible present al sòl original i el límit superior queda fixat per la concentració màxima permesa d'alguns dels HM presents en sòls segons la legislació sobre HM en sòls, fangs i substrats del *Real Decreto 1310/1990* i la seva actualització del 2010 recollida al B.O.E als números 262 de l'1 de novembre del 1990 i el número 170 del 2 de juliol de 2010, respectivament.

Un cop s'ha realitzat el dopatge amb els HM i s'ha deixat establir el sòl durant una setmana, es porten a terme les extraccions dels bacteris d'aquests (apartat experimental, secció 2.8.8) per realitzar els assajos microbiològics que permetran comprovar si el creixement bacterià es veu impedit després de l'addició de les diferents concentracions de HM (ja que el que es vol veure són diferències de degradació per canvis en la seva activitat, com a conseqüència dels diferents nivells de contaminació de HM). Cal dir que, segons la bibliografia, els estudis per determinar la tolerància dels microorganismes exposats a metalls s'han dut a terme tradicionalment de dues maneres diferents, a causa de discrepàncies entre els autors. Hi ha els qui proposen primer l'extracció dels bacteris del sòl i després el sembrat en plaques de Petri que contenen un medi al qual s'ha afegit els metalls en forma de les seves sals. Segueixen aquest procediment per tal d'evitar la incertesa en la disponibilitat dels metalls com a resultat de l'adsorció d'aquests al sòl [44,45,46]. D'altres autors prefereixen la introducció dels metalls en forma de les seves sals directament al sòl i deixar un temps de contacte després de la seva addició, per establir el creixement microbià després de l'estrès influït a les comunitats bacterianes per la contaminació introduïda [47,48]. Pel cas d'estudi es decideix utilitzar el segon procediment ja que d'aquesta manera la introducció dels contaminants es realitza sobre una mostra de sòl que preserva les característiques pròpies (OC, carbonats, etc.), la qual cosa representa de forma més acurada el medi natural on es troben els microorganismes i també coincideix amb el procediment utilitzat en la preparació dels microcosmos.

Així doncs, un cop dopat el sòl a diferents concentracions de metalls i deixats en contacte durant una setmana, es procedeix a l'extracció dels bacteris del sòl, al sembrat, la incubació i, finalment,

el recompte de colònies, seguint el mateix procediment que per la determinació de les unitats formadores de colònies (CFU), descrit a l'apartat experimental (secció 2.8.8). A la Figura 28 es mostren, a mode d'exemple, algunes de les plaques de Petri utilitzades pel cultiu dels microorganismes extrets del sòl. D'esquerra a dreta (columnes) es mostren alguns dels creixements de colònies bacterianes en presència de les diferents concentracions de HM (sòl original no dopat, x2, x5, x10, x50, x100, x250). De dalt a baix (files), es mostren els creixements a diferents dilucions incubades procedents de l'extracte del sòl (10^{-3} , 10^{-2} , 10^{-1} , cada nivell per duplicat), dutes a terme per tal de seleccionar el nivell més adequat pel recompte.

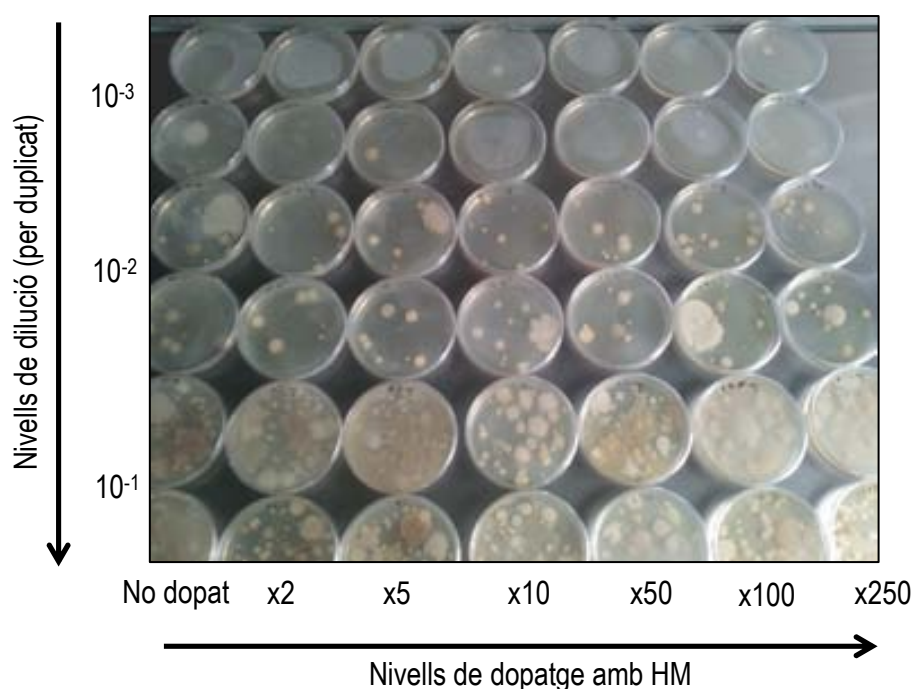


Figura 28. Creixements de les comunitats bacterianes extretes del sòl després del seu sembrat i incubació a diferents concentracions de metalls

Els resultats del recompte de CFU per gram de sòl es presenten a la Taula 13 (només es presenten els resultats corresponent a la dilució 10^{-2} , ja que a la de 10^{-3} no s'observa creixement i a la dilució 10^{-1} no és possible fer el recompte a causa del gran nombre de CFU presents). Es pot comprovar que el creixement bacterià (expressat pel nombre de CFU per gram de sòl dopat) és molt similar per totes les concentracions de HM introduïdes, després d'una setmana en contacte. El creixement no es veu impedit ni tan sols als nivells superiors (x500 i x1000), als quals s'ha introduït una concentració de metalls totals que assoleix un valor aproximat de $1600 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$. Aquests resultats representen l'oportunitat de poder seleccionar un ampli interval de concentracions de metalls per dur a terme els diferents estudis de degradació dels PAHs, des de

la concentració biodisponible original trobada al sòl fins als límits màxims permesos segons la legislació vigent.

Taula 13. Recompte de les unitats formadores de colònies (CFU) per gram de sòl dopat amb diferents concentracions de metalls

| Nivell de dopatge amb HM | CFU·g⁻¹ (x10⁻⁴) (± CI₉₅ %, n=2) |
|---------------------------------|---|
| No dopat | 1,5 ± 0,4 |
| x2 | 1,3 ± 0,2 |
| x5 | 1,5 ± 0,2 |
| x10 | 1,1 ± 0,3 |
| x50 | 1,3 ± 0,1 |
| x100 | 1,4 ± 0,1 |
| x250 | 1,4 ± 0,3 |
| x500 | 2,2 ± 0,2 |
| x1000 | 1,9 ± 0,2 |

Així doncs, es decideix preparar els microcosmos per a l'estudi de la influència de quatre concentracions diferents de HM en la degradació dels PAHs: sense dopar (activitat del sòl original), x10, x250 i x500. El nivell més baix seleccionat de HM és el x10 ja que, en un estudi previ de degradació de PAHs, s'havia observat que la degradació d'aquests en un sòl dopat per arribar al doble de la concentració biodisponible de HM no era significativament diferent a la del mateix sòl sense dopar [49]. El nivell x250 ha estat seleccionat com el nivell intermedi i el de x500 com el major, ja que el nivell x1000, supera, pels casos del Cu, Pb i Zn, el límit de concentració de HM fixat per la legislació vigent [34].

Tal i com es comenta a l'apartat experimental (secció 2.10.2) els HM s'introdueixen a partir de les seves sals dissoltes en aigua, Cr(NO₃)₃·9H₂O, Mn(NO₃)₂·4H₂O, Co(NO₃)₃·6H₂O, Ni(NO₃)₂·6H₂O, CuSO₄·5H₂O, Zn(NO₃)₂·6H₂O i Pb(NO₃)₂, per arribar a tenir les concentracions mostrades a la Taula 14 als microcosmos. A la primera columna es mostra la concentració biodisponible de la mostra de sòl original (expressada en mg·kg⁻¹) aproximada a un nombre que facilita la preparació de les dissolucions per a procedir al dopatge (per exemple, es van trobar 159 µg·kg⁻¹ de Cr, que corresponen als 0,160 mg·kg⁻¹, recollits a la Taula 12 i, per facilitar la preparació de solucions de

HM a introduir al sòl, s'aproxima a 0,150 mg·kg⁻¹). Com es pot observar, es mantenen les proporcions del sòl original, Zn, Mn > Cu > Cr, Pb > Ni > Co.

Taula 14. Concentració assolida de HM als diferents microcosmos

| | Sense dopar (mg·kg⁻¹) | x10 (mg·kg⁻¹) | x250 (mg·kg⁻¹) | x500 (mg·kg⁻¹) |
|------------|---|-------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| Cr | 0,150 | 1,50 | 37,5 | 75,0 |
| Mn | 0,500 | 5,00 | 125 | 250 |
| Co | 0,0100 | 0,100 | 2,50 | 5,00 |
| Ni | 0,0500 | 0,500 | 12,5 | 25,0 |
| Cu | 0,250 | 2,50 | 62,5 | 125 |
| Zn | 0,500 | 5,00 | 125 | 250 |
| Pb | 0,150 | 1,50 | 37,5 | 75,0 |
| ΣHM | 1,61 | 16,1 | 402 | 805 |

Els HM s'introdueixen en forma de nitrats principalment, ja que l'activitat microbiològica funciona a un interval de relació C:N:P òptims. Com que el dopatge amb PAHs comporta l'addició de grans quantitats de fonts de carboni, es considera dopar els HM, principalment, a partir de la dissolució de les seves sals nitrades. Lei *et al.* (2005) van observar indicis de que la degradació dels PAHs es veu potenciada per l'addició de N i P [50] i Betancur-Galvis *et al.* (2006) van veure que la concentració de Phe no variava significativament sense l'addició de N i P, però decreixia més de 25 vegades en afegir-ne [51]. De totes maneres, la recerca sobre l'efecte de la proporció i addició de nutrients sobre la degradació dels PAHs és, encara, molt limitada [52].

Recopilant el resultat dels estudis preliminars duts a terme (esquematitzats a la Figura 29), es decideix estudiar la degradació de cinc PAHs (Phe, Fluo, Pyr, BbF i BaP) en presència de set HM (Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn i Pb), a quatre nivells de concentració de metalls (concentració biodisponible trobada al sòl, x10, x250 i x500), al llarg de 2 mesos, al sòl de Sabadell.

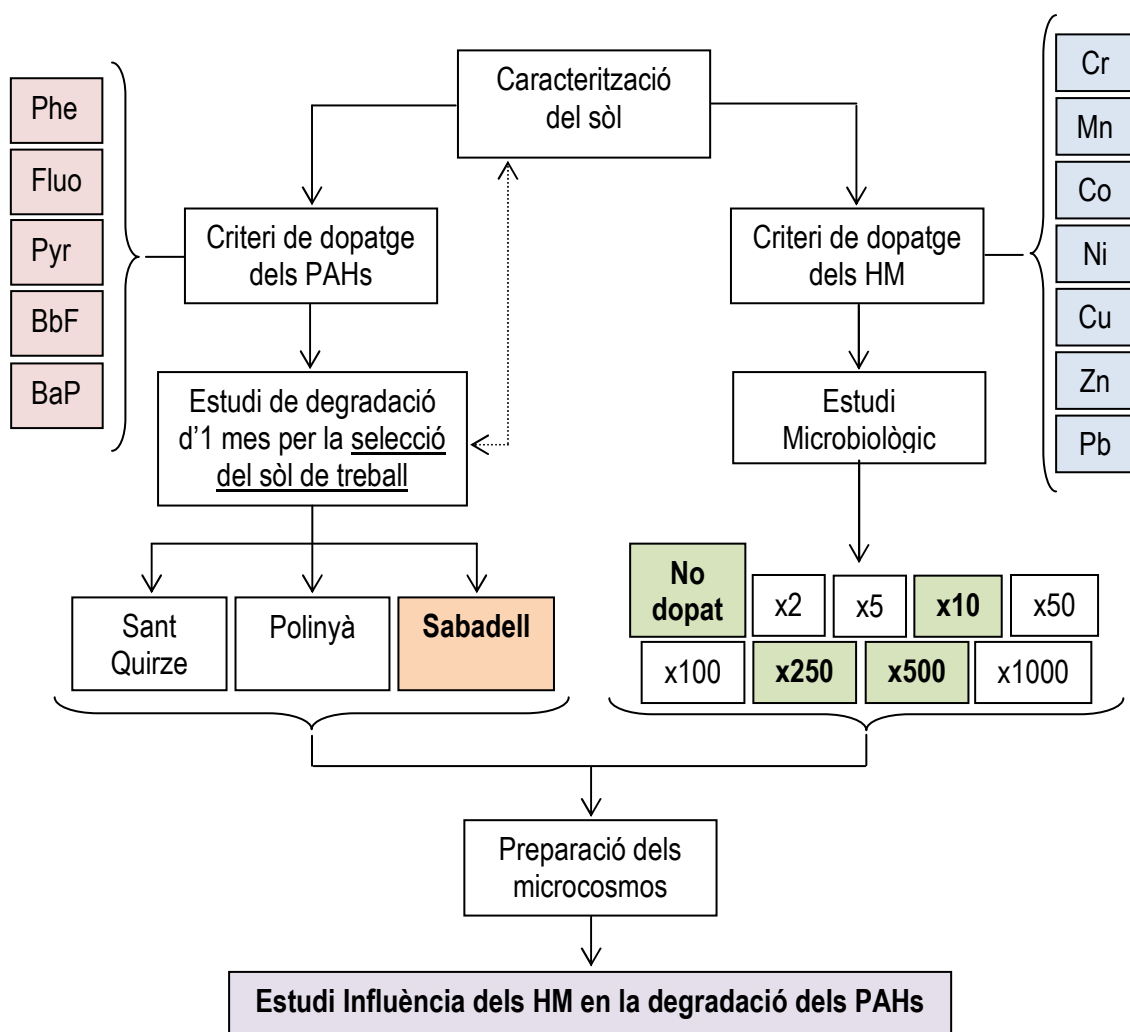


Figura 29. Representació de les diferents etapes per portar a terme l'estudi de la influència de diferents concentracions de HM en la degradació dels PAHs.

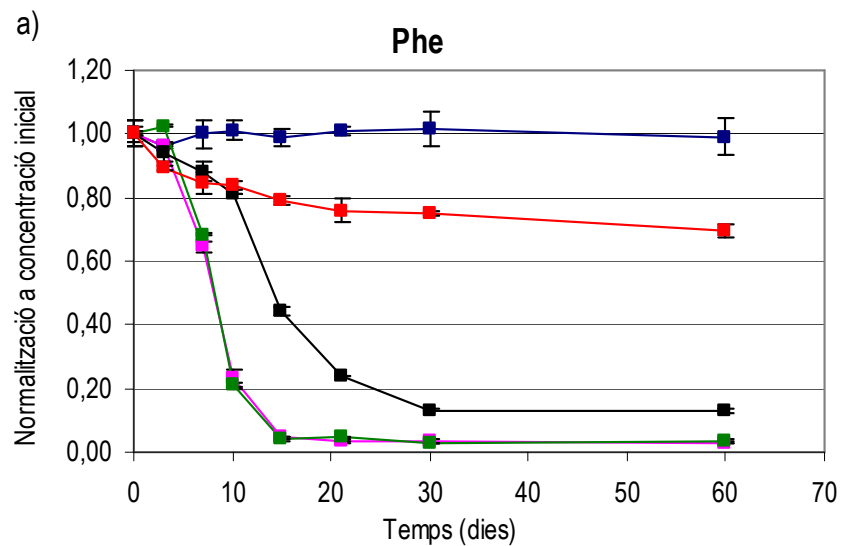
3.4.4. DEGRADACIÓ DELS PAHs EN PRESENCIA DE DIFERENTS CONCENTRACIONS DE HM ALS MICROCOSMOS

A la Figura 30 es presenten els resultats de la degradació dels cinc PAHs estudiats en presència de diferents concentracions de metalls (sòl no dopat corresponent a la concentració biodisponible original, nivells x10, x250 i x500). L'eix d'ordenades representa el la concentració de PAHs determinada al llarg del temps, la qual es troba normalitzada respecte la concentració inicial d'aquests analitzada a temps 0 dies, després de l'addició de 20 mg·kg⁻¹ de cadascun dels PAH (ΣPAHs de 100 mg·kg⁻¹) i a l'eix d'abscisses es representa el temps (dies). A l'Annex 5 es recullen, a mode d'exemple, alguns dels cromatogrames obtinguts durant l'anàlisi dels

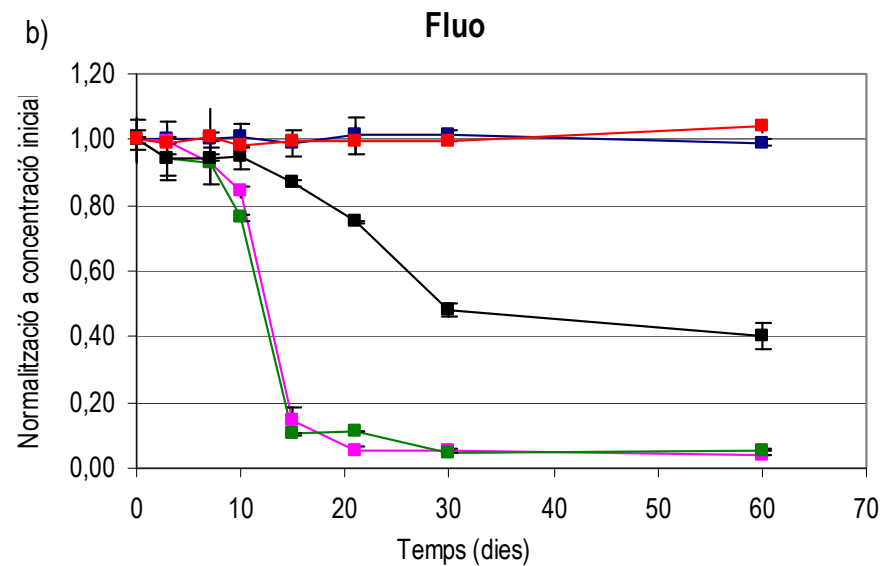
microcosmos als diferents nivells de metalls pesants (pels temps 0, 15 i 60 dies)[§]. El control de qualitat de les anàlisis dels PAHs es porta a terme mitjançant la determinació de patrons de control al llarg de l'anàlisi (*Continuing Calibration Verification*) i a través de l'anàlisi per duplicat de cadascun dels microcosmos (a la vegada injectats per duplicat al GC/MS). A la Figura 30, es pot observar que la SD és molt petita, la qual cosa informa de que s'ha realitzat una òptima homogeneïtzació dels microcosmos després de la introducció dels PAHs, els quals es troben repartits per tota la matriu del sòl. Per altra banda, també s'analitzen quatre microcosmos (rèpliques del nivell x250 als temps 0, 7, 15 i 30 dies), i s'observa que les diferències entre els dos són inferiors al 8 %, provant així que el procediment seguit en la preparació dels microcosmos és altament reproducible (s'analitzen només duplicats per quatre microcosmos a mode de control, ja que en estudis previs de degradació dels PAHs ja s'havia observat que les diferències entre dos replicats d'un mateix microcosmos era inferior al 10 % [49]). Finalment, es procedeix a l'anàlisi d'un blanc al llarg del temps, corresponent a l'anàlisi del sòl esterilitzat, dopat amb els PAHs i amb el nivell intermedi dels metalls (x250). La determinació d'aquest blanc demostra que la concentració de PAHs trobada als diferents temps es manté sempre al voltant de la concentració inicial introduïda (proper a 1, segons el valor normalitzat). Aquest fet prova que la degradació observada és, principalment, producte de l'activitat dels microorganismes i no per altres tipus de reaccions químiques o fotooxidacions. De fet, es coneix que l'activitat enzimàtica és la força motriu principal de totes les transformacions bioquímiques que succeeixen al sòl [53].

A la Figura 30 s'observen diferents tendències de degradació, les quals es poden dividir en dos grups. Per una banda, el Phe, Pyr i Fluo (3, 4 i 4 anells, respectivament) i, per altra banda, el BbF i el BaP (5 anells). El Phe forma part dels anomenats PAHs de baix pes molecular (LMWPAHs), mentre que els altres quatre pertanyen als anomenats PAHs d'alt pes molecular (HMWPAHs). Es pot comprovar que les diferències de degradació existents als diferents nivells de HM són més acusades pels casos dels Phe, Pyr i Fluo, així com també el percentatge de degradació. Pel cas d'aquests tres (Figura 30 a), b) i c)), de manera general, s'observa que, a mesura que augmenta la concentració de metalls, la degradació dels PAHs és més lenta. No s'observen diferències significatives entre la degradació dels PAHs que té lloc al sòl original (sense dopar) i la que té lloc al sòl dopat amb 10 vegades la concentració de HM biodisponible (x10) ja que, possiblement,

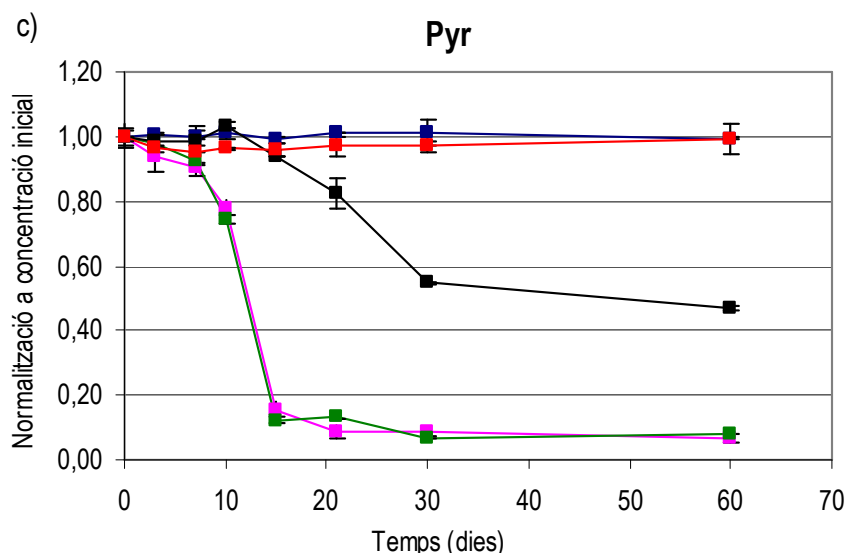
[§] Als cromatogrames de l'Annex 3 es pot observar que els temps de retenció dels diferents PAHs són lleugerament inferiors als del cromatograma de la mescla patró mostrat a la secció 3.1.1, a causa de que la columna s'ha anat escurçant al llarg dels anys per les operacions de manteniment (canvi de precolumna, escurçament de la columna cromatogràfica, etc.), sense efectes importants per les necessitats de separació de l'estudi en curs.



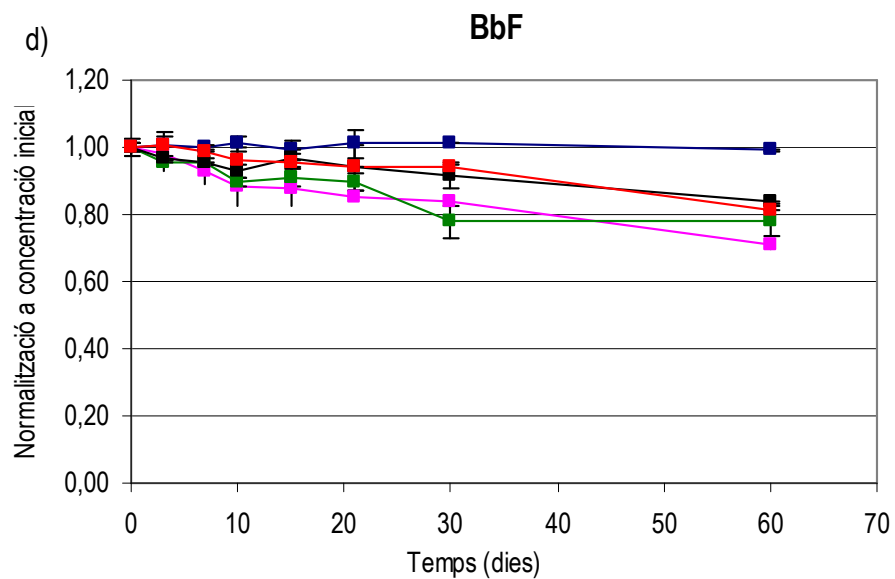
Blanc Sense dopar amb HM x10 HM X250 HM X500 HM



Blanc Sense dopar amb HM x10 HM X250 HM X500 HM



Blanc Sense dopar amb HM x10 HM X250 HM X500 HM



Blanc Sense dopar amb HM x10 HM X250 HM X500 HM

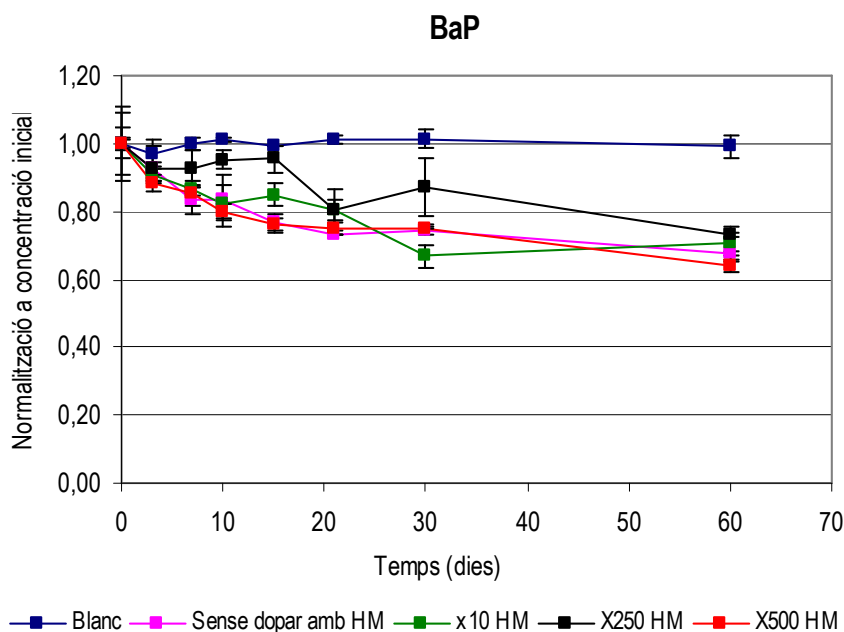


Figura 30. Degradació dels PAHs al llarg del temps a diferents concentracions de metalls a) Degradació Phe b) Degradació Fluo c) Degradació Pyr d) Degradació BbF e) Degradació BaP. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats de l'anàlisi de cada microcosmos (n=2)

la quantitat introduïda de metalls no representa una gran toxicitat pels microorganismes presents al microcosmos. Pel cas del Phe, al cap de 10 dies, la degradació ha arribat al 77 % al sòl sense dopar i al 79 % al nivell x10, en canvi, el Pyr (22 i 25 %) i el Fluo (16 i 24 %) segueixen un ritme més lent. Per aquests darrers PAHs no s'arriba a percentatges de degradació més elevats fins al cap de 15 dies, sent pel Pyr de 84 i 88 % i pel Fluo de 85 % i 90 %, en els sòls sense dopar i el dopat x10, respectivament. En aquests instants, el Phe ha estat eliminat quasi completament (95 i 96%). Aquests resultats concorden amb la literatura existent, ja que el Phe és un PAH de menor pes molecular i conté unes zones anomenades "regió badia" i "regió K" (comentat a la introducció, secció 1.2.2) que representen una conformació òptima per l'ancorat de molts enzims (per exemple, a la regió K, l'atac oxidatiu és comú en les vies de degradació de molts microorganismes) [16]. També s'observa que pels dos nivells més baixos de HM, la degradació arriba a un *plateau* al cap de 20 dies, a partir de la qual roman constant, havent-se degradat gairebé tot el Phe (97 % en els dos casos), Fluo (96 i 94 %) i Pyr (93 i 92 %).

A diferència del que s'observa a baixes concentracions de HM, les diferències s'accentuen pels nivells x250 i x500. Pel nivell x250, no s'arriba a degradar el voltant d'un 80 % de Phe fins passats 21 dies, quan als sòls sense dopar amb HM o dopats amb una concentració x10 aquest percentatge s'assolia als 10 dies. Ara, al cap de 10 dies, només es degrada el 19 % de Phe, i la

degradació màxima a la qual s'arriba al cap de dos mesos és del 87 % pel nivell x250. Tot i així, aquest valor és força major que pels casos del Fluo i Pyr, molt més similars entre ells (4 anells cadascun), en què al cap de 15 dies només s'ha degradat el 13 i 6 % i al cap de dos mesos no s'arriba a més del 60 % i 53 % de degradació, respectivament. Finalment, pel nivell de HM més alt (x500), no s'observa una degradació significativa de Fluo ni de Pyr per part dels microorganismes, i només es transforma un 30 % de Phe. Per tant, es pot concloure que s'evidencia una disminució important en la degradació del Phe, Fluo i Pyr a mesura que augmenta la concentració de HM.

Per altra banda, la degradació observada del BbF i del BaP a les diferents concentracions de HM és substancialment diferent a la del Phe, Fluo i Pyr. Es pot comprovar que no existeixen grans diferències en la degradació als diferents nivells de metalls introduïts. Pel cas del BbF, la degradació al llarg del temps sembla ser major quan no s'ha dopat amb metalls o bé al nivell x10, tot i que al cap de 60 dies els percentatges de degradació dels 4 nivells de contaminació acaben sent força similars (29 % sense dopar, 22 % (x10), 16 % (x250) i 19 % (x500)), en cap cas arribant al 30 % de degradació al cap de dos mesos. Aquestes similituds es poden comprovar també, al cap de dos mesos, pel BaP (32 % sense dopar, 30 % (x10), 27 % (x250) i 36 % (x500)).

Aquests resultats mostren que el Phe és més degradat que el Fluo i Pyr i, aquests més que el BbF i BaP. De fet, dins la comunitat científica, és àmpliament acceptat que els PAHs de baix pes molecular (LMWPAHs) són degradats molt més ràpidament que els d'alt pes molecular (HMWPAHs) a causa de la major adequació per les comunitats microbianes a l'hora d'utilitzar-los com a font exclusiva de carboni [54]. Els HMWPAHs també poden constituir una font de carboni pels microorganismes, però no n'hi ha massa que els puguin degradar eficientment. Aquest fet ve determinat, principalment, per l'augment de pes molecular, la qual cosa comporta una disminució de la seva solubilitat i l'augment de la hidrofobicitat i, per tant, de la biodisponibilitat. Una altra raó és la falta d'inducció enzimàtica, que és més complicada a causa de la seva conformació i major grandària, i provoca que els PAHs no es trobin tan accessibles pels centres actius dels enzims involucrats en el metabolisme dels microorganismes. Tot i això, Yun *et al.* (2008), van observar que un grup de bacteris dels sediments de manglar** utilitza el BaP com a única font de carboni i energia [55] i Sun *et al.* (2010) van veure que una comunitat enriquida de bacteris utilitzava el Pyr, Fluo i BaP amb el mateix propòsit [56]. Silva *et al.* (2009) explicaven

** Els manglars són una formació vegetal llenyosa, densa i arbúcia d'1 a 30 metres d'alçada, situada generalment a zones costeres i prop dels rius, propis de zones tropicals (Mèxic és el país amb més quantitat de Manglars)

que alguns microorganismes són capaços de degradar alguns PAHs entre 2 i 7 anells en condicions molt limitades d'oxigen [57]. Malgrat aquests exemples, no és habitual que els HMWPAHs representin la font de carboni principal dels microorganismes i és per això que la seva degradació més lenta es pot explicar per un fenomen anomenat co-metabolisme [58]. El co-metabolisme es defineix com una reacció enzimàtica no-específica entre un nou substrat que competeix amb un substrat primari de similar estructura per la zona activa de l'enzim [16]. Aquest fenomen explica que l'activitat bacteriana que condueix a la degradació dels HMWPAHs es veu potenciada per la presència d'altres fonts de carboni amb estructures més simples. Algunes d'aquestes fonts de carboni inclouen els PAHs més petits que actuen com a substrat inicial, activant el metabolisme dels microorganismes que, en absència de LMWPAHs, no degradarien els HMWPAHs. Yuan *et al.* (2001) van observar que la presència del Phe potenciava la biodegradació de l'Anth, Flu i Pyr [59], en canvi Du *et al.* (2011) van comprovar que pel cas d'una espècie anomenada *Polyporellus picipes*, l'addició d'Anth provocava una major degradació del Phe i Pyr [60]. Hwang *et al.* (2003) i Igwo-Ezikpe *et al.* (2010), també van veure que la presència de Phe contribuïa a l'augment de biomassa quan actuava com a co-substrat pel co-metabolisme del Chry, Flu i Pyr [61,62]. Couling *et al.* (2010) i Wang *et al.* (2010) coincidien en què l'addició de mesclures de PAHs permetia degradar els de major pes molecular a expenses de la reducció dels més petits per inhibició de tipus competitiva [63,64], tot i que, recentment, Ni *et al.* (2011), han patentat una soca d'un bacteri anomenat *Bacillus pumilus* †† capaç de degradar completament el Phe quan s'utilitza com a co-substrat pel co-metabolisme del BaP, el qual es degrada fins a percentatges que no superen el 50 % [65]. A més, a la vegada, els HMWPAHs més petits, com ara el Pyr, estan involucrats en el co-metabolisme del BaP, segons Boonchan *et al.* (2000) [66]. Recentment, Wen *et al.* (2011) van observar diferències en la degradació del Pyr en afegir nous substrats diferents dels PAHs com el segó de blat ††, glucosa, àcid salicílic, etc., i va concloure que, en aquests casos, la degradació del Pyr podia arribar a augmentar en un 22 % [67]. Totes aquestes investigacions concorden amb els perfils de degradació observats en aquest estudi dut a terme on s'observa que la degradació del Flu i Pyr sempre comença a activar-se més tard que la del Phe (inclús als diferents nivells de metalls). També es pot veure que en esgotar-se el Phe, la velocitat de degradació del Flu i Pyr disminueix substancialment. Aquestes observacions podrien explicar-se mitjançant el fenomen del co-metabolisme, coincidint així amb la majoria dels autors citats.

†† Una soca bacteriana és una variant genètica concreta d'un tipus de bacteri.

‡‡ El segó del blat és la capa dura externa del gra de blat

Pel que fa al perfil de degradació dels PAHs, per aquells casos on se n'observa (nivells sense dopar, x10 i x250), es poden diferenciar tres etapes diferents. Una primera etapa, que sol comprendre els primers 3-7 dies, en què l'activitat de degradació dels microorganismes és latent o baixa, reportada també per altres autors. Wen *et al.* (2011) van observar aquest comportament i explicaven que durant aquesta fase d'adaptació hi ha una manca d'activitat com a conseqüència de l'alt estrès influït pels contaminants sobre les comunitats bacterianes, les quals exhibeixen diferent tolerància [67]. A partir d'aquí, les comunitats més resistents superen la fase d'adaptació i evolucionen donant lloc a una segona etapa, normalment compresa entre els 7-30 dies, en què la degradació succeeix de manera molt més ràpida. Finalment, la tercera etapa, a partir dels 30 dies, consisteix en l'arribada a un estat estable, de tipus *plateau*. En alguns casos s'observa una estabilització total com a conseqüència de l'esgotament de les fonts de carboni assimilables pels microorganismes (per exemple, pels casos del Phe a tots els nivells menys el x500) i, en d'altres, s'observa que no s'arriba a una estabilització completa, sinó una disminució de la velocitat de degradació (per exemple, pel Fluo i Pyr al nivell x250). Aquests perfils de degradació genèrics també van ser obtinguts per Couling *et al.* (2010) a diferents nivells de concentració dels PAHs de 75, 150 i 300 mg·kg⁻¹, tant per a sistemes amb PAHs únics com amb mescles d'ells (Naph, Phe, Pyr) [63]. Aquests autors van veure que el temps d'adaptació necessari per les comunitats bacterianes era dependent de la concentració dels PAHs introduïda, establint una relació directa entre els sòls amb més CFU·g⁻¹ amb aquells on el percentatge de degradació dels PAHs era major. Wang *et al.* (2010) van establir la mateixa relació entre la quantitat de microorganismes i la seva capacitat de degradació per mescles d'11 PAHs, contenint, entre d'altres, el Phe, Fluo, Pyr, BbF i BaP, aquí estudiats [64].

A part dels diferents perfils de degradació observats, els resultats representats a la Figura 30 mostren clarament que la presència d'altres concentracions de metalls té, en conjunt, un efecte negatiu i inhibidor en la capacitat de degradació dels microorganismes. Comparant aquestes observacions amb els pocs estudis existents sobre la co-existència de PAHs i HM, Thavamani *et al.* (2012) van observar que l'alta presència d'aquests dos tipus de contaminants causava un impacte en les poblacions microbianes i en la seva activitat, provocant dos efectes principals. Per una banda, una disminució de la biodiversitat, és a dir, la pèrdua d'espècies de microorganismes i, per l'altra, la predominança d'unes espècies concretes com a resultat de la pressió selectiva dels PAHs i HM [53], efectes també observats per Almas *et al.* (2004) [68]. Per altra banda, en termes de degradació, Khan *et al.* (2009) publicaven valors significativament majors de degradació del Pyr en presència de mescles de Pyr i Pb (30 mg·kg⁻¹ i 300 mg·kg⁻¹,

respectivament) que pel Pyr aïllat ($30 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Sugerien que el Pb promou el creixement bacterià a través de l'eliminació del Pyr (descontaminació), la qual cosa es tradueix en una acceleració en la degradació d'aquest PAH [69]. Moreau *et al.* (1999) també havien vist que la presència de Zn podia comportar un increment en l'eliminació de Phe [70], en contrapartida amb l'estudi publicat recentment per Obuekwe *et al.* (2013), el qual determina que el Zn (entre $50\text{-}1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) i el Cu ($50\text{-}100 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) no produeixen cap efecte significatiu en la degradació de Phe al llarg de 60 dies. Ara bé, la presència de Cu a major concentració ($500\text{-}1000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), porta a la reducció de l'activitat de l'enzim deshidrogenasa (el qual catalitza les reaccions de reducció-oxidació dels compostos orgànics) i, per tant, afecta negativament a la capacitat de degradació del Phe [71] i resulta ser un tòxic directe pels microorganismes a nivell cel·lular [72]. En la mateixa línia, Shen *et al.* (2005), van observar que la interacció entre Zn i BaP tenia un efecte negatiu en l'activitat d'un enzim anomenat ureasa [73]. En tots aquests estudis, però, s'avaluen les interaccions entre metalls i PAHs de forma individual, i suggereixen que el comportament de mescles de contaminants en mostres complexes com els sòls poden ser molt variades, des d'efectes negatius i positius, fins a efectes additius, sinèrgics i/o antagònics. A l'estudi d'aquesta tesi doctoral s'observa, precisament, l'efecte resultant de les mescles de diferents concentracions de HM amb PAHs i la influència que tenen els primers en el procés de degradació dels segons. Aquest tipus d'estudi proporciona informació sobre l'efecte global observat en la degradació dels PAHs en presència d'una sèrie de HM, mescles contaminants trobades habitualment sòl, però no és útil per avaluar les interaccions individuals de cadascun dels HM amb els diferents PAHs.

A mode de resum, s'ha vist que la biodegradació dels PAHs segueix moltes vies diferents (aeròbiques i anaeròbiques), que es troba afectada per diversos factors (paràmetres fisicoquímics del sòl, etc.) i que és diferent per cadascun dels PAHs (segons la seva mida, conformació, si representen fonts directes de carboni o la seva degradació és a través del co-metabolisme). A més, la degradació depèn de la biodisponibilitat dels contaminants i de l'eficiència d'utilització d'aquests com a font d'energia i carboni per part dels microorganismes a través d'activitats de tipus enzimàtic, les quals es poden veure afectades per múltiples factors, com ara la presència de HM. També s'ha vist que la degradació dels PAHs als sòls és dependent del tipus o mescles d'hidrocarburs a les quals es troben exposades les comunitats bacterianes, la concentració d'aquestes, la duració de l'exposició i els efectes sinèrgics i/o antagònics amb altres PAHs i/o altres tipus de contaminants.

Pel cas d'estudi, s'ha determinat la degradació dels PAHs a diferents concentracions de HM. S'ha vist que el Phe, Fluo i Pyr són degradats més ràpidament que el BbF i BaP, i s'ha comprovat que el progressiu augment de la concentració de HM constitueix, de manera general, un efecte inhibidor en l'activitat metabòlica dels microorganismes que degraden els PAHs. Per altra banda, no s'ha observat que la presència de diferents concentracions de HM afavoreixi la degradació de cap dels PAHs.

Aquests resultats mostren una tendència general de l'efecte de la presència de dos tipus de contaminants mesclats de naturalesa diferent (inorgànics i orgànics). Per altra banda, també remarquen la importància de la descontaminació del sòl mitjançant la separació de les espècies metàl·liques presents, sobretot, si és pretén aplicar tasques de bioremediació de PAHs de manera eficient en aquests tipus de matrius.

3.4.5. DETERMINACIÓ DE METABÒLITS HIDROXILATS COM A PRODUCTE DE DEGRADACIÓ DEL PAHs ALS MICROCOSMOS

Se segueix l'aparició dels possibles derivats monohidroxilats del Phe i Pyr, el 9-OHPhe i l'1-OHPyr, al llarg dels 2 mesos, en els mateixos microcosmos utilitzats per estudiar la degradació dels PAHs a diferents concentracions de HM. L'anàlisi d'aquests es porta a terme seguint la metodologia MAE-MIPs-HPLC/FLD, desenvolupada a la secció 3.2.

S'ha pogut detectar i quantificar el 9-OHPhe al llarg dels dos mesos però en cap cas s'ha detectat la presència de l'1-OHPyr. El perfil d'aparició/degradació al llarg del temps del 9-OHPhe a les diferents concentracions de HM es representa a la Figura 31. Per tots els casos s'observa una concentració inicial de 9-OHPhe entre 7-45 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ que augmenta fins arribar a un màxim de 130 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ al cap de 10 dies. A partir d'aquí, es produeix una disminució més o menys contínua fins als 21 dies en què es determina una concentració de 9-OHPhe de 20 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ i, a continuació, s'aprecia un segon augment de concentració fins als 45 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Finalment, es pot observar la desaparició del 9-OHPhe de forma lineal a partir dels 30 dies fins assolir nivells no quantificables a partir dels 60 dies ($< 2 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$)^{§§}.

^{§§} El MQL pel 9-OHPhe és de 23 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, per la qual cosa, en els casos en què la concentració es troba per sota del MQL es porta a terme un pas de concentració amb l'evaporador rotatori de l'extracte purificat mitjançant SPE MIPs. L'extracte purificat de 6 mL es concentra fins 0,5 mL, la qual cosa representa un factor de concentració de 12 vegades, de manera que es redueix el MQL fins a aproximadament 2 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$.

Es pot comprovar que el perfil d'aparició/degradació del 9-OHPhe és pràcticament idèntic per tots els nivells de metalls introduïts així com pel nivell no dopat amb metalls i també del blanc (sòl esterilitzat, dopat amb els PAHs i amb el nivell intermedi dels metalls (x250)). A mode d'exemple, a la Figura 32 es mostren els cromatogrames obtinguts de l'anàlisi del 9-OHPhe als microcosmos dopats amb PAHs i el nivell x250 de HM, des del temps inicial (0 dies) fins als 60 dies. La variació de concentració de 9-OHPhe observada al blanc pot tenir diferents significats;

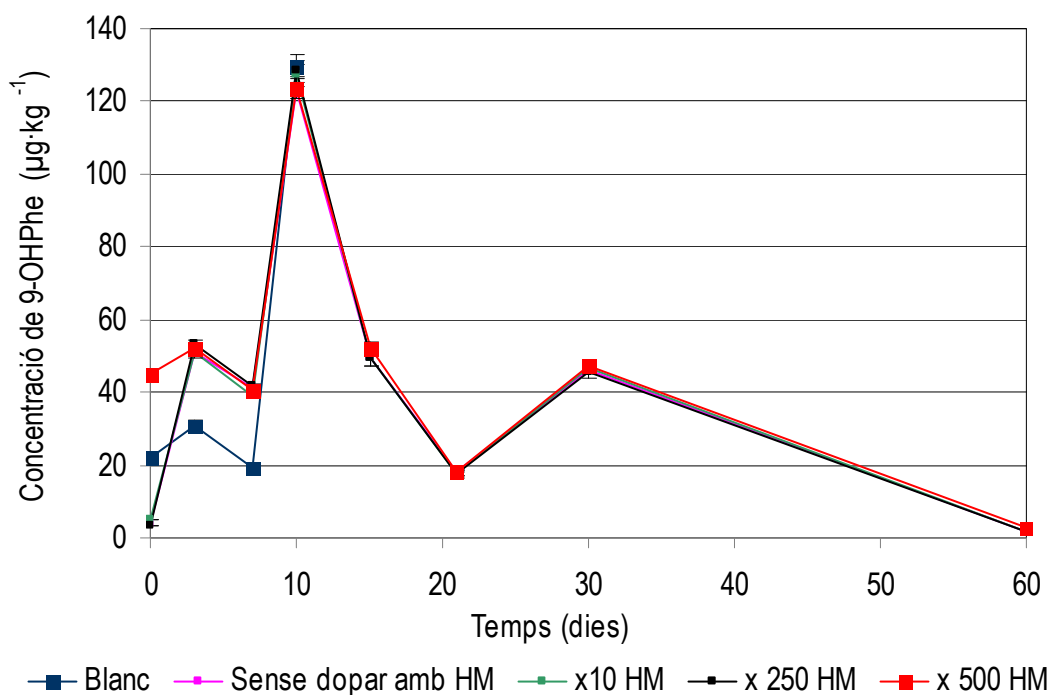


Figura 31. Seguiment de l'aparició/desaparició del 9-OHPhe al llarg del temps en sòls dopats amb PAHs i a diferents concentracions de HM. Les barres d'error indiquen la desviació estàndard dels replicats de l'anàlisi de cada microcosmos (n=2)

per una banda, que l'esterilització del blanc no s'ha completat al cent per cent i, per l'altra, que la degradació pot tenir lloc a través d'altres tipus de mecanismes com, per exemple, per reaccions de fotooxidació o d'altres oxidacions químiques. La fotooxidació pot tenir lloc ja que els PAHs absorbeixen fortament l'energia UV (300-420 nm), la qual cosa provoca la seva ràpida fotòlisi i desemboca en la formació de derivats oxigenats [74]. De totes maneres, sembla poc probable que aquest mecanisme de degradació hagi tingut lloc ja que els microcosmos s'incuben en condicions de foscor. Una altra possibilitat d'obtenció dels PAHs oxigenats és l'oxidació química dels PAHs a través de reaccions amb espècies com l'O₃, ·OH i NO_x [75]. Per exemple, la formació de radicals hidroxils pot venir de la reacció amb el Fe present al sòl a través d'un mecanisme de tipus Fenton (H₂O₂ + Fe²⁺ → ·OH + OH⁻ + Fe³⁺) [76]. La degradació dels PAHs per algun d'aquests processos justificaria no només el fet de l'observació de degradació al blanc,

sinó també els perfils similars de degradació a les diferents concentracions de HM, ja que aquests processos no es veuen afectats per la presència d'aquests contaminants, a diferència del que passa amb l'activitat enzimàtica dels microorganismes.

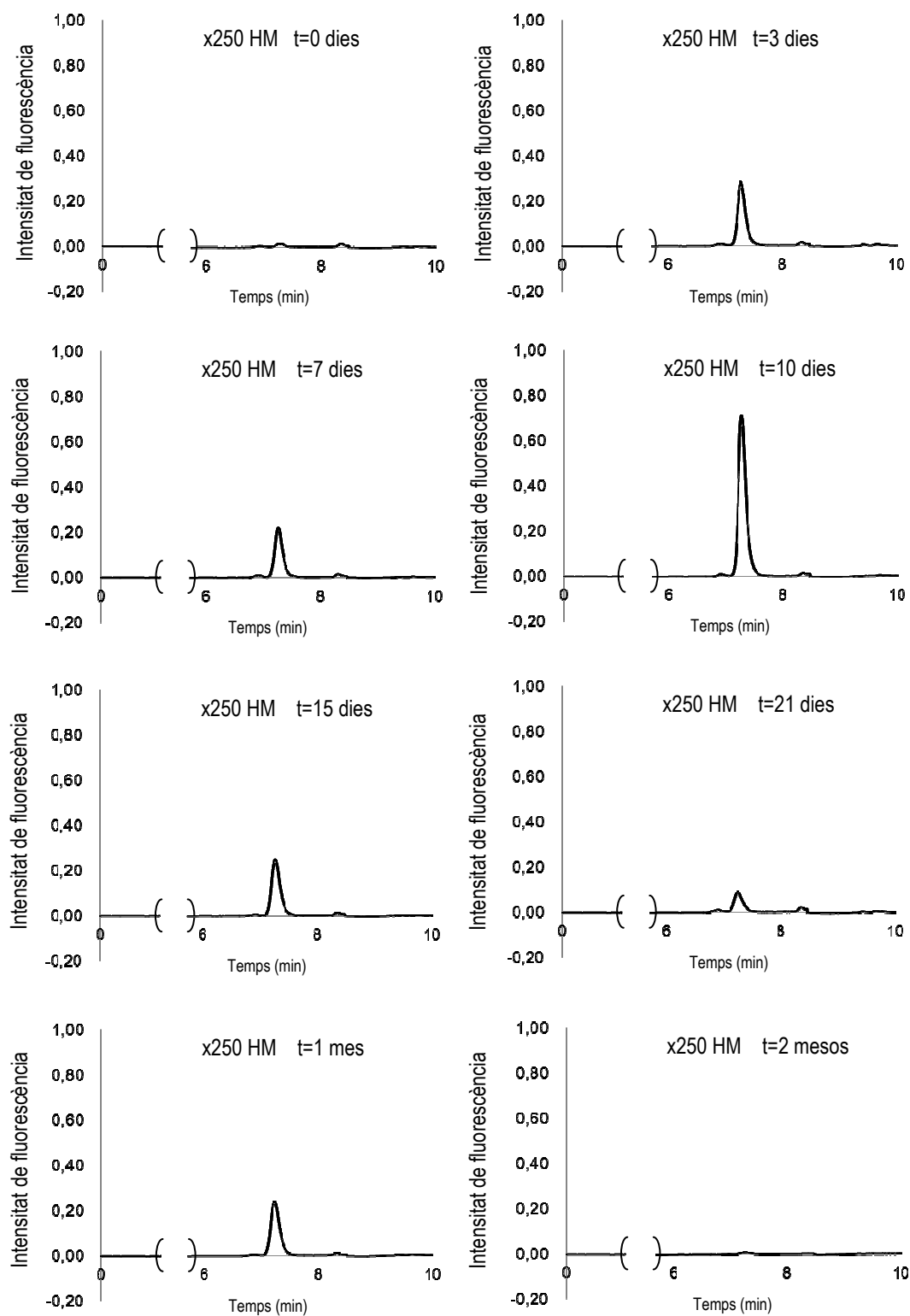


Figura 32. Cromatogrames mostrant l'aparició de 9-OHPhe com a resultat de la degradació del Phe al microcosmos dopat amb PAHs i HM (x250) al llarg de 2 mesos. El pic observat correspon a l'aparició/desaparició del 9-OHPhe

Cal tenir en compte que la concentració màxima trobada de 9-OHPhe al cap de 10 dies ($130 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) implica que s'ha degradat el 0,6 % possible provinent de Phe (la qual cosa correspon a $0,130 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Phe) i l'error associat a la determinació de Phe a la Figura 30a, a aquest temps, és del 2,1 % (la qual cosa correspon a $\pm 0,320 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de Phe). Com que aquest darrer interval de concentració és major que la concentració de Phe a partir del qual es generaria el 9-OHPhe, no es pot assegurar si l'aparició del derivat hidroxilat prové de la degradació per l'activitat microbiològica (en cas que el sòl no hagi estat completament esterilitzat) o provingui d'altres tipus de reaccions i no s'observaria als blancs de la Figura 30. De totes maneres, els resultats obtinguts concorden força amb un tipus de degradació microbiològica. En aquests tipus de reaccions, una de les raons per les quals la concentració de 9-OHPhe trobada és molt baixa és que els carbonis 9 i 10 del Phe solen ser oxidats amb una probabilitat del 0-7 %, mentre que les posicions 5, 6, 7 i 8 (ó 1, 2, 3 i 4) ho fan amb una probabilitat $> 30 \%$ (Figura 33) [77].

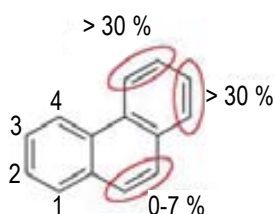


Figura 33. Punts d'oxidació del Fenantrè amb els percentatges de probabilitat de distribució

Per altra banda, es coneix que el Phe és degradat a múltiples productes a través de moltes vies, un dels quals és el metabòlit hidroxilat 9-OHPhe. Aquest apareix com a intermedi durant la formació de derivats oxigenats més estables com la 9,10-Fenantrenquinona o bé el 9-Fenantril b-D-glucopiranòsid. El 9-OHPhe es forma i desapareix, a la vegada, per diferents vies segons alguns mecanismes proposats, fet que podria explicar l'aparició de diversos màxims de concentració en la confluència d'aquests mecanismes conflueixen [77].

També s'ha formulat la hipòtesi de que els diferents màxims de concentració observats a la Figura 31 poden correspondre a la utilització del Phe com a font de carboni per part de diferents comunitats de microorganismes a diferents temps. D'aquesta manera, una porció del Phe es degradaria a 9-OHPhe, el qual desapareixeria fins ser mineralitzat totalment i, al cap d'un temps, ho faria un altre grup de bacteris, donant lloc a perfils com el representat a la Figura 31.

Amb tot, la determinació dels derivats hidroxilats en sòls es troba encara en un estat inicial, en què calen mètodes fiables i robusts amb els quals es puguin dur a terme anàlisis a nivell traça i

ultra-traça. Encara que molts dels derivats oxigenats dels PAHs no formen part de la llista de contaminants emergents a tenir en compte actualment, la disponibilitat de la seva anàlisi és molt important ja que són compostos potencialment més carcinògens que els PAHs i, a més, poden servir com a marcadors d'exposició a aquests (contaminants controlats per la legislació).

Per altra banda, és necessari aprofundir en el coneixement dels mecanismes utilitzats pels microorganismes per dur a terme la degradació dels diferents PAHs, així com l'elucidació dels intermedis formats. Aquest és un objectiu de futur que es troba dificultat per la gran varietat d'espècies de microorganismes presents en les diverses matrius, la gran diversitat d'interaccions entre elles així com amb la presència d'altres fonts contaminants com ara els HM, com s'ha mostrat mitjançant els resultats obtinguts en aquest treball.

3.5. RESUM DE RESULTATS

A continuació es destaquen els resultats obtinguts més rellevants.

Quant a la metodologia d'anàlisi dels PAHs (secció 3.1):

- ✓ S'ha optimitzat un mètode per l'anàlisi cromatogràfica dels PAHs mitjançant GC/MS, el qual ha demostrat ser sensible, reproducible, amb bons DL ($0,13-4,98 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) i QL ($0,43-16,42 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) i que permet separar els 16 PAHs considerats com a contaminants prioritaris per la US EPA amb bona resolució per la seva anàlisi en mostres de sòls en menys de 38 min.
- ✓ S'han avaluat diferents mètodes de purificació dels extractes de sòl. La SPE amb sílice compactada, la cromatografia en columna mixta amb gel de sílice i alumina i la cromatografia en columna amb gel de sílice han demostrat ser mètodes efectius de purificació amb bones recuperacions dels diferents PAHs (87-118 %). A més, no s'ha observat una pèrdua important dels analits d'interès durant l'aplicació d'aquests mètodes de purificació. Per altra banda, la purificació dels PAHs mitjançant SPE C18 ha demostrat no ser un mètode adequat per tal finalitat ja que s'observen altes pèrdues durant l'etapa de càrrega dels analits al cartutx de SPE C18, probablement a causa de la baixa polaritat de la fase adsorbent. Per aquest darrer cas, a més, s'ha observat que la

velocitat de càrrega de l'extracte líquid al cartutx té una influència significativa en la recuperació dels analits d'interès.

- ✓ L'ús de CRMs per a la validació de diferents metodologies per l'anàlisi de PAHs en sòls ha permès demostrar que la millor metodologia analítica consisteix en el MAE, seguit de la purificació mitjançant SPE amb sílice compactada o la cromatografia en columna mixta amb gel de sílice i alúmina i, finalment, l'anàlisi instrumental per GC/MS, amb bons MDL (0,002-0,053 mg·kg⁻¹) i MQL (0,008-0,174 mg·kg⁻¹).
- ✓ S'han observat diferències significatives en els resultats de les anàlisis dels PAHs en tres mostres de sòls després d'aplicar dos tipus de pretractaments de mostra (tamisat i mòlta). S'ha vist que l'aplicació d'ambdues accions condueix a una major determinació de PAHs en el contingut del sòl (per exemple, 254 µg·kg⁻¹ pel cas de Sant Quirze) en comparació amb l'aplicació del tamisat i la mòlta per separat (220 i 153 µg·kg⁻¹, respectivament). Així doncs, l'aplicació de les dues accions (tamisat i mòlta) serà el procediment aconsellat pel pretractament de mostra previ a l'extracció dels compostos orgànics dels sòls estudiats en aquesta tesi.

Pel que fa a la nova metodologia desenvolupada per l'anàlisi dels OH-PAHs (secció 3.2):

- ✓ S'ha desenvolupat una nova metodologia d'anàlisi d'OH-PAHs basada en el MAE, seguit de la purificació selectiva mitjançant polímers impremtats molecularment (MIPs) i l'anàlisi final per HPLC/FLD.
- ✓ S'han optimitzat les condicions d'extracció: temperatura i mescla de solvents extractants, la qual cosa ha permès seleccionar l'acetonitril:toluè (9:1) i els 120 °C com dos dels paràmetres òptims per a l'extracció dels OH-PAHs dels sòls.
- ✓ S'han optimitzat les condicions de purificació de la SPE MIPs: tipus i volum de solvent d'elució, la qual cosa ha permès seleccionar 6,00 mL de metanol amb un 2 % d'àcid acètic com a paràmetres òptims per l'elució dels OH-PAHs durant la purificació de les mostres d'un sòl. A més, s'ha demostrat l'alta rapidesa i selectivitat dels MIPs front els OH-PAHs gràcies al mecanisme de retenció a través del reconeixement molecular i la

poca influència d'altres tipus d'interaccions de tipus polar, iòniques, etc. Aquest fet ha permès dur a terme les anàlisis sense interferències importants, tant de compostos similars presents als sòls com per efecte de la matriu. A més, la SPE MIPs aporta l'avantatge de ser un mètode de preconcentració, la qual cosa permet realitzar l'anàlisi de traces d'aquests compostos.

- ✓ S'han optimitzat els paràmetres relacionats amb l'anàlisi cromatogràfica dels OH-PAHs: longitud d'ona d'excitació/emissió, condicions de fase mòbil, etc., la qual cosa ha permès la separació, identificació i quantificació dels 4 OH-PAHs estudiats en menys de 10 min.
- ✓ El nou procediment analític per l'anàlisi d'OH-PAHs en mostres de sòls, MAE-MIPs-HPLC/FLD, presenta baixos límits de detecció (0,003-0,014 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) i quantificació (0,010-0,044 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), bons percentatges de recuperació (68-93 %) i alta reproductibilitat (2-8 % de RSD). Per altra banda és ràpid en termes de preparativa de mostra i altament sensible als compostos estudiats en comparació amb un de més tradicional (MAE-sililació-GC/MS) i d'altres reportats a la bibliografia. També presenta avantatges importants en termes d'eliminació d'interferències (ja que evita l'etapa de sililació dels OH-PAHs abans de la seva anàlisi).
- ✓ El nou mètode ha estat aplicat per l'anàlisi d'alguns derivats metabòlits hidroxilats procedents de la degradació dels PAHs en microcosmos de forma satisfactòria, la qual cosa demostra la seva adequació per a l'anàlisi d'OH-PAHs en mostres de sòls contaminats. En particular, és el primer cop que s'utilitza la SPE MIPs com a mètode de purificació selectiva d'extractes de mostres de sòls per a l'anàlisi d'OH-PAHs.

En referència amb la caracterització de les mostres de Polinyà, Sabadell, Sant Quirze i Terrassa:

- ✓ Arran de la caracterització de les mostres de sòls estudiats en aquesta tesi doctoral, s'ha observat que, de forma general, són poc humits (1,3-9,4 %), amb pH moderadament bàsic (7,77-8,34), moderats en carbonats (6-11 %), baix contingut en MO (0,9-1,5 %), no salins (69-194 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$) i amb un contingut mitjà en CFU (1,5-8,0 \cdot 10³ CFU \cdot g⁻¹). Tots aquests factors contribueixen en la diferent mobilitat i biodisponibilitat dels

contaminants estudiats presents al medi, els quals es troben a baixa concentració (metalls pesants i PAHs), la qual cosa permet pensar que les interaccions de les mescles d'aquests poden jugar un paper important en els processos metabòlics que tinguin lloc al sòl pels microorganismes presents i, per tant, en el caràcter tòxic del mateix.

Sobre els estudis de la influència de diferents concentracions de HM en la degradació dels PAHs: (secció 3.4):

- ✓ S'ha seleccionat el sòl de Sabadell com a sòl de treball a partir de les dades de caracterització dels diferents sòls, d'un estudi preliminar de degradació dels PAHs (sense HM) introduïts a una sèrie de microcosmos i de les activitats de tipus antropogènic que poden haver afectat les diferents zones de presa de mostra els darrers anys.
- ✓ S'ha seleccionat el nivell de dopatge dels PAHs ($20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ de cadascun dels PAHs) als microcosmos en funció de la determinació del contingut d'aquests al sòl i dels nivells habituals utilitzats per altres autors (per tal d'estandarditzar el mètode de preparació).
- ✓ S'ha seleccionat el nivell de dopatge dels HM (x10, x250 i x500 vegades la concentració biodisponible de HM al sòl) a partir d'estudis preliminars de degradació dels PAHs a baixes concentracions de HM, d'un estudi microbiològic per comprovar la toxicitat influïda als microorganismes, en termes de creixement bacterià, pels diferents nivells de metalls introduïts.
- ✓ S'ha dissenyat una estratègia de preparació dels microcosmos per tal d'introduir els dos tipus de contaminants al mateix, en diferents porcions de sòl, estèrils o no, en solvent orgànic i/o aigua. S'han tingut en compte paràmetres com la humitat, pH, temperatura, radiació solar, per tal de minimitzar l'alteració de les característiques de la mostra.
- ✓ S'han vist diferències significatives en la degradació dels PAHs a les diferents concentracions de HM al llarg de dos mesos sent. De forma general, s'observa una disminució de la degradació a mesura que augmenta la concentració de HM. S'ha vist

que l'addició als microcosmos de 10 vegades la concentració biodisponible trobada al sòl no té un efecte significatiu en la degradació dels PAHs de menor pes molecular (Phe, Fluo, Pyr), mentre que a nivells majors disminueix progressivament la capacitat de degradació. Pels PAHs de major pes molecular no s'ha observat una influència important en la degradació per cap dels nivells de HM introduïts als microcosmos.

- ✓ Els perfils de degradació dels PAHs de menor pes molecular (Phe, Fluo i Pyr) mostren tres fases diferenciades (fase d'adaptació, fase d'alta velocitat de degradació i fase d'estabilització), no observada pels PAHs de major pes molecular.
- ✓ S'ha seguit l'aparició d'un derivat monohidroxilat (9-OHPhe) en els microcosmos dissenyats per seguir l'evolució de la degradació dels PAHs a diferents concentracions de HM. S'ha observat que el perfil de formació/degradació és gairebé idèntic per tots els nivells de HM i també del blanc, amb màxims a temps 3 dies, 10 dies i 30 dies. Això pot significar que la degradació pot estar succeït pels microorganismes presents al sòl i/o per altres tipus de reaccions químiques. Per altra banda, la observació d'etapes successives d'aparició/desaparició del 9-OHPhe permet formular la hipòtesi que diferents grups de bacteris utilitzen el Phe com a font de carboni en diferents moments, conduint a l'aparició de diferents pics de concentració de P-OHPhe al llarg del temps.

3.6. BIBLIOGRAFIA

-
- [1] Y. Ling, C. Lifshitz, *J. Phys. Chem.*, 1998 (102) 708.
- [2] M. Nadal, M. Schuhmacher, J. L. Domingo, *Environ. Pollut.*, 132 (2004) 1.
- [3] Gobierno de España, Real Decreto 9/2005, Anexo V: Listado de contaminantes y elementos genéricos de referencia para la protección de la salud humana en función del uso del suelo. BOE, 15 (2005) 1833.
- [4] D. Harvey, *Modern Analytical Chemistry*, Ed. McGraw-Hill (2000), Nova York, Estats Units.
- [5] P. Oleszczuk, S. Baran, *J. Hazard. Mater.*, 113 (2004) 237.
- [6] T. Oluseyi, K. Olayinka, B. Alo, R. M. Smith, *Int. J. Environ. Res.*, 5 (2011) 681.
- [7] A. K. M. Kabzinski, J. Cyran, R. Juszczak, *Pol. J. Environ. Stud.*, 11 (2002), 695.
- [8] M. H. Habibi, M. R. Hadjmohammadi, *Iran. J. Chem. Chem. Eng.*, 27 (2008) 91.
- [9] A. Andrade-Eiroa, V. Leroy, P. Dagaut, Y. Bedjanian, *Chemosphere*, 78 (2010) 1342.
- [10] US EPA, <http://www.epa.gov/lawsregs/> [En línia], Març 2010.
- [11] S. W. Karickhoff, A. R. A. Baker, *Contaminants and Sediments*, Ed. Ann Arbor Science Publishers (1980), Ann Arbor, Estats Units.
- [12] K. G. Robinson, W. S. Farmer, J. T. Novak, *Water Res.*, 24 (1990) 345.
- [13] E. M. Murphy, J. M. Zachara, S. C. Smith, *Environ. Sci. Technol.*, 24 (1990) 1507.
- [14] P. Conte, A. Zena, G. Pilidis, A. Piccolo, *Environ. Pollut.*, 112 (2001) 27.
- [15] C. Walgraeve, K. Demeestere, J. Dewulf, R. Zimmermann, H. V. Langenhove, *Atmos. Environ.*, 44 (2010) 1831.
- [16] X. X. Zhang, S. P. Cheng, J. C. Zhu, S. L. Sun, *Pedosphere*, 16 (2006) 555.
- [17] F. Portet-Koltalo, K. Oukebdane, F. Dionnet, P. L. Desbène, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390 (2008) 389.
- [18] B. A. M. Bandowe, W. Wilcke, *J. Environ. Qual.*, 39 (2010) 1349.
- [19] A. I. Barrado, S. Garcia, Y. Castrillejo, R. M. Perez, *Atmos. Poll. Res.*, 3 (2012) 81.
- [20] T. Luan, S. Fang, Y. Zhong, L. Lin, S. M. N. Chan, C. Lan, N. F. Y. Tam, *J. Chromatogr. A*, 1173 (2007) 37.
- [21] L. C. A. Amorim, J. M. Dimandja, Z. L. Cardeal, *J. Chromatogr. A*, 1216 (2009) 2900.
- [22] N. Grova, F. Monteau, B. Le Bizec, C. Feidt, F. Andre, G. Rychen, *J. Anal. Toxicol.*, 29 (2005) 175.
- [23] S. Meyer, S. Cartellieri, H. Steinhart, *Anal. Chem.*, 71 (1999) 4023.
- [24] X. Wang, L. Lin, T. Luan, L. Yang, N. F. Y. Tam, *Anal. Chim. Acta*, 753 (2012) 57.

- [25] G. J. Verrhiest, B. Clement, B. Volat, B. Montuelle, Y. Perrodin, *Chemosphere*, 46 (2002) 187.
- [26] E. Sepic, M. Bricelj, H. Leskovsek, *Chemosphere*, 52 (2003) 1125.
- [27] T. Kobayashi, Y. Murai, K. Tatsumi, Y. Iimura, *Sci. Total Environ.*, 407 (2009) 5805.
- [28] FAO/IIASA/ISRIC/ISS-CAS/JRC, *Harmonized World Soil Database-version 1.0(2008)*. FAO, Rome, Italy and IIASA, Laxenburg, Àustria.
- [29] R. M. Pawar, *The effect of soil pH on degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)*, Tesi Doctoral (2012), University of Hertfordshire, Hertfordshire, Regne Unit.
- [30] K. Kazeev, M. Kutrovskii, E. Dadenko, L. Vezdeneeva, S. Kolesnikov, V. Valkov, *Eurasian Soil Sci.*, 45 (2012) 282.
- [31] R. J. A. Jones, R. Hiederer, E. Rusco, P. J. Loveland, L. Montanarella, *The Map of Organic Carbon in Topsoils in Europe, Version 1.2 September 2003: explanation of Special Publication Ispra 2004 No.72 (S.P.I.04.72)*. european Soil Bureau Research Report No.17, EUR 21209 EN, Office for Official Publication of the European Communities (2004), Luxemburg, Luxemburg.
- [32] J. D. Rhoades, F. Chanduvi, S. Lesch, *Soil Salinity Assessment*, Ed. FAO Fiat Panis, Riverside, Estats Units.
- [33] Gobierno de España, Ley 22/2011, <http://www.boe.es/buscar/doc.php?id=BOE-A-2011-13046> [En línia], Agost 2010.
- [34] Gobierno de España, Real Decreto 1310/1990, <http://www.boe.es/boe/dias/1990/11/01/pdfs/A32339-32340.pdf>, [En línia], Setembre 2010.
- [35] Gobierno de España, Real Decreto 865/2010, <http://www.boe.es/boe/dias/2010/07/14/pdfs/BOE-A-2010-11153.pdf> [En línia], Setembre 2010.
- [36] Gobierno de España, Real Decreto 1310/1990, <http://www.boe.es/boe/dias/1990/11/01/pdfs/A32339-32340.pdf> [En línia], Març 2013.
- [37] W. Peijnenburg, *Dev. Soil Sci.*, 29 (2004) 245.
- [38] R. A. Wuana, F. E. Okieimen, *ISRN Ecol.*, DOI:10.5402/2011/402647 (2011).
- [39] M. Niepceron, F. Martin-Laurent, M. Crampon, F. Portet-Koltalo, M. Akpa-Vinceslas, M. Legras, D. Bru, F. Bureau, J. Bodilis, *Environ. Pollut.*, 180 (2013) 199.
- [40] P. H. Lee, S. K. Ong, J. Golchin, G. L. Nelson, *Wat. Res.*, 35 (2001) 3941.
- [41] E. Galán, A. Romero, *Macla*, 10 (2008) 48.
- [42] M. C. Newman, C. H. Jagoe, A. J. L. Hameling, P. F. Landrum, H. L. Bergman, W. H. Benson, *Bioavailability-Physical, Chemical and Biological Interactions*, Ed. CRC Press Inc. (1994), Boca Raton, Estats Units.
- [43] D. Bakircioglu, Y. B. Kurtulus, H. Ibar, *Clean-Soil, Air, Water*, 39 (2011) 728.

- [44] G. Altug, N. Balkis, *Environ. Monit. Assess.*, 149 (2009) 61.
- [45] J. S. Angle, R. L. Chaney, D. Rhee, *Soil Biol. Biochem.*, 25 (1993) 1443.
- [46] H. Hattori, *Soil. Sci. Plant Nutr.*, 38 (1992) 93.
- [47] L. Holtan-Hartwig, M. Bechmann, T. R. Hoyas, R. Linjordet, L. R. Bakken, *Soil Biol. Biochem.*, 34 (2002) 1181.
- [48] M. Díaz-Raviña, E. Baath, A. Frostegard, *Appl. Environ. Microb.*, 60 (1994) 2238.
- [49] A. Jordà, *Caracterització de l'efecte de metalls pesants en la degradació d'hidrocarburs aromàtics policíclics*, Projecte Final de Carrera (2012), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Espanya.
- [50] L. Lei, A. P. Khodadoust, M. T. Suidan, H. H. Tabak, *Water Res.*, 39 (2005) 349.
- [51] L. A. Betancur-Galvis, D. Alvarez-Bernal, A. C. Ramos-Valdivia, L. Dendooven, *Chemosphere*, 62 (2006) 1749.
- [52] X. Y. Lu, T. Zhang, H. H. P. Fang, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89 (2011) 1357.
- [53] P. Thavamani, S. Malik, M. Beer, M. Megharaj, R. Naidu, *J. Environ. Manage.*, 99 (2012) 10.
- [54] J. L. Stroud, G. I. Paton, K. T. Semple, *FEMS Microbiol. Lett.*, 272 (2007) 120.
- [55] T. Yun, Y. R. Luo, T. L. Zheng, L. Z. Cai, X. X. Cao, C. L. Yan, *Mar. Pollut. Bull.*, (2008) 1184.
- [56] R. Sun, J. H. Jin, G. D. Sun, Y. Liu, Z. P. Liu, *J. Environ. Sci.*, 22 (2010) 1576.
- [57] I. S. Silva, M. Grossman, L. R. Durrant, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 63 (2009) 224.
- [58] R. A. Kanaly, S. Harayama, *J. Bacteriol.*, 182 (2000) 2059.
- [59] S. Y. Yuan, J. S. Chang, J. H. Yen, B. V. Chang, *Chemosphere*, 43 (2001) 273.
- [60] L. N. Du, D. W. Gao, *Zhongguo Huanjing Kexue*, 31 (2011) 277.
- [61] S. Hwang, T. J. Cutright, *Environ. Sci. Pollut. R.*, 10 (2003) 277.
- [62] M. N. Igwo-Ezipke, O. G. Gbenle, M. O. Ilori, J. Okpuzor, A. A. Osuntoki, *Res. J. Environ. Sci.*, 4 (2010) 317.
- [63] N. R. Couling, M. G. Towell, K. T. Semple, *Environ. Pollut.*, 158 (2010) 3411.
- [64] C. Wang, F. Wang, T. Wang, Y. Bian, X. Yang, X. Jiang, *J. Hazard. Mater.*, 176 (2010) 41.
- [65] J. Ni, T. Zhu, *Faming Zhuanli Shenging*, (2011) Patent nº CN 102174446.
- [66] S. Boonchan, M. L. Britz, G. A. Stanley, *Appl. Environ. Microb.*, 66 (2000) 1007.
- [67] J. Wen, D. Gao, B. Zhang, H. Liang, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 65 (2011) 600.
- [68] A. R. Almas, L. R. Bakken, J. Mulder, *Soil Biol. Biochem.*, 36 (2004) 805.
- [69] S. Khan, A. E. L. Hesham, G. Qing, L. Shuang, J. He, *J. Soil. Sediment.*, 9 (2009) 482.
- [70] C. J. Moreau, P. L. Clerks, C. N. Haas, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 37 (1999) 251.

- [71] I. S. Obuekwe, K. T. Semple, *Environ. Monit. Assess.*, DOI 10.1007/s 10661-013-3311-3 (2013)
- [72] J. Sokhn, F. A. A. M. De Leij, T. D. Hart, J. M. Lynch, *Lett. Appl. Microbiol.*, 33 (2001)164.
- [73] G. Shen, Y. Lu, J. Hong, *Ecotox. Environ. Safe.*, 63 (2005) 474.
- [74] M. Krauss, W. Wilcke, *Environ. Pollut.*, 122 (2003) 75.
- [75] J. Y. Lee, D. A. Lane, *Atmos. Environ.*, 43 (2009) 4886.
- [76] S. Jonsson, Y. Persson, S. Frankki, B. Van Bavel, S. Lundstedt, P. Haglund, M. Tysklind, J. Hazard. Mater., 149 (2007) 86.
- [77] V. Kutcherov, A. Kolesnikov, *Hydrocarbon*, Ed. Intech (2013), Rijeka, Croàcia.

CAPÍTOL QUART

CONCLUSIONS GENERALS

4. CONCLUSIONS GENERALS

La recerca duta a terme al llarg d'aquesta tesi doctoral ha contribuït al desenvolupament de noves metodologies de determinació analítica per tal d'ampliar el coneixement de temes relacionats amb la contaminació ambiental. Les conclusions més específiques dels resultats obtinguts s'han destacat al final de cada capítol i aquí es resumeixen les més rellevants. Com a resultat de les investigacions dutes a terme s'han generat una sèrie de perspectives de futur, les quals també s'indiquen a continuació.

- ✓ La nova metodologia d'anàlisi de PAHs optimitzada als laboratoris del Centre Grup de Tècniques de Separació en Química ha estat implantada de forma exitosa i permet dur a terme les anàlisis d'aquests compostos per assegurar el compliment de la legislació vigent. Les diferents etapes estudiades (extracció, purificació i anàlisi instrumental) han permès seleccionar la combinació més adient per poder analitzar els PAHs en mostres de sòls, i l'ús d'un CRM el qual ha assegurat la traçabilitat dels resultats experimentals. A més, s'ha conclòs que és necessari incloure el tamisat i el molturat en l'etapa de pretractament de mostra abans de l'extracció dels PAHs dels sòls.

- ✓ La nova metodologia per l'anàlisi dels OH-PAHs ha estat desenvolupada de forma satisfactòria i aporta avantatges en termes de reducció d'interferències del temps de pretractament de mostra (entre d'altres paràmetres), en comparació amb una metodologia més tradicional i d'altres descrites a la bibliografia. S'ha utilitzat amb èxit la tecnologia dels polímers impremtats molecularment (MIPs), per primera vegada, en la seva variant d'extracció en fase sòlida, per a la purificació selectiva de mostres de sòls per l'anàlisi dels OH-PAHs. El nou mètode desenvolupat permet la determinació de derivats monohidroxilats dels PAHs mostres de sòls.

- ✓ L'estudi de la presència de diferents concentracions de HM en microcosmos preparats amb una mostra de sòl ha permès demostrar que existeix una influència significativa d'aquests en el procés de degradació d'alguns PAHs. Per altra banda, no s'ha pogut

concloure que la diferent concentració de HM tingui un efecte significatiu en el mecanisme de formació dels OH-PAHs.

- ✓ S'han aplicat satisfactòriament els mètodes desenvolupats i optimitzats en la primera part del treball per a la determinació dels PAHs i OH-PAHs en els microcosmos preparats per dur a terme els estudis de la influència dels metalls pesants en el procés de degradació dels PAHs.

La recerca duta a terme al llarg d'aquesta tesi doctoral així com els resultats obtinguts, deixen obertes diverses perspectives de futur gràcies a, principalment, la multidisciplinarietat del treball realitzat i el diferent nombre de col·laboracions amb centres de Catalunya i França. Algunes de les possibles tasques a desenvolupar com a continuació d'aquesta tesi doctoral es detallen a continuació.

Pel que fa a la nova metodologia desenvolupada per l'anàlisi d'OH-PAHs en sòls:

- ✓ Ampliar la nova metodologia desenvolupada a l'anàlisi de major quantitat d'OH-PAHs i a diferents mostres de sòls (zones dedicades agricultura, vorals de carreteres, etc.).
- ✓ Transport de les metodologies desenvolupades per l'anàlisi dels PAHs i OH-PAHs en sòls a l'anàlisi d'aquests compostos, per exemple, en orines, amb un clar enfoc a l'anàlisi clínica i la utilització de certs marcadors per avaluar-ne l'exposició humana amb l'objectiu de complementar una de les línies de recerca del Centre Grup de Tècniques de Separació (GTS), en el camp de la medicina.

Quant als estudis de degradació dels PAHs en presència de diferents metalls:

- ✓ Estudiar la cinètica degradació dels PAHs amb diferents combinacions de metalls i PAHs i l'aïllament de comunitats bacterianes específiques, incloent les diferents interaccions possibles dins del model cinètic. D'aquesta manera, es podria determinar no només l'efecte global observat en la degradació, sinó la influència dels diferents contaminants, la seva concentració, i els agents degradants presents de forma específica.

- ✓ Assignació d'estructura molecular als pics desconeguts observats en l'anàlisi dels derivats hidroxilats com a producte de la degradació dels PAHs. Necessitat d'utilització, per exemple, d'un HPLC/MS o HPLC/MS/MS, la qual cosa obriria noves col·laboracions existents entre el centre GTS i d'altres centres que disposin d'aquesta tecnologia.

Altres possibles aplicacions com a resultat del treball dut a terme en aquesta tesi doctoral serien:

- ✓ Ús de les metodologies desenvolupades en combinació amb d'altres també desenvolupades al grup de recerca en l'àmbit dels biomaterials de l'aplicació de biomaterials com a tècnica de bioremediació de zones contaminades, en aquest cas, amb PAHs. Per exemple, fer el seguiment de l'eficiència del suro utilitzat per a l'adsorció de PAHs presents en matrius com l'aigua (actualment es desenvolupa una tesi sobre la biosorció de metalls pesants).
- ✓ A més de l'aplicació esmentada en orines, utilització de la tecnologia dels polímers imprimats molecularment per a tasques d'extracció/purificació selectiva de diferents famílies de compostos en diferents matrius. Per exemple, l'ús de MIPs relacionada amb l'especiació de metalls pesants, la qual constitueix una de les línies de recerca més consolidades dins el grup GTS.

ANNEXOS

ANNEX 1

MOLECULARLY IMPRINTED POLYMERS-LIQUID CHROMATOGRAPHY/FLUORESCENCE FOR THE
SELECTIVE CLEAN-UP OF HYDROXYLATED POLYCYCLIC AROMATIC HYDROCARBONS IN SOILS

Oriol Baltrons, Montserrat López-Mesas, Cristina Palet, Franck Le Derf, Florence Portet-Koltalo

“accepted”

Molecularly imprinted polymers-liquid chromatography/fluorescence for the selective clean-up of hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in soils

Oriol Baltrons^a, Montserrat López-Mesas^{*a}, Cristina Palet^a, Franck Le Derf^b and Florence Portet-Koltalo^b

Received in 22th July 2013, Accepted 14th September 2013

DOI: 10.1039/C3AY41227J

Hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAHs), a group of metabolites produced during the biodegradation of PAHs by microorganisms, are known to be difficult to analyze from complex environmental or biological matrices. In the field of contaminated soils, where OH-PAHs are less studied, a new method was compared to a common method for the analysis of monohydroxylated PAHs metabolites: 2-naphthol, 2-hydroxyfluorene, 9-phenanthrol and 1-hydroxypyrene. After optimizing the microwave assisted extraction (MAE) step, the obtained extracts, containing the OH-PAHs together with the corresponding PAHs, were purified by molecularly imprinted polymers (MIPs). MIPs showed an effective selectivity for the hydroxylated derivatives studied (and not for native PAHs), which allowed their identification and quantification by HPLC/FLD. By this method, good limits of detection (0.003-0.014 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) and limits of quantification (0.010-0.044 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) were achieved. On the other hand, following the common method, the sample extract was concentrated by evaporation, silylated, and analyzed by GC/MS. The new method was more sensitive for all OH-PAHs and, the analysis showed less matrix effects due to the use of MIPs clean-up. In the present work the advantages and disadvantages of the new method are shown, as well as the possible application to soil biodegradation studies.

1 Introduction

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a wide group of organic pollutants produced by the incomplete combustion of organic matter at high temperatures and pressures¹. Their carcinogenic and mutagenic characteristics have attracted the attention of the scientific community. They are constituted of two or more fused benzene rings and are found in multiple matrices in the environment, such as water, air, soils, food, etc. PAHs have been extracted from environmental matrices by many methods, such as ultrasounds², supercritical fluid extraction (SFE)³, accelerated solvent extraction (ASE)⁴, microwave assisted extraction (MAE)⁵ or Soxhlet⁶, among others. Several chromatographic techniques have been used to detect and quantify these pollutants, like high-performance liquid chromatography with fluorescence detection (HPLC-FLD)⁷ and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS)⁸.

In soils, PAHs are known to degrade into metabolites through different paths, processes naturally controlled by many microorganisms like *Pseudomonas*, *Burkholderia cepacia*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*^{9,10} and other groups like actinomycetes¹¹, white-rot fungi¹², etc. A group of the derivatives produced by these degradation processes by microorganisms are the so called hydroxylated metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbons (OH-PAHs). OH-PAHs are intermediates derivatives of PAHs degradation pathways, processes that involve enzymatic reactions (O_2 Cyt P450 monooxygenase, etc.) and also non-enzymatic rearrangements and ortho and meta fissions. These are fast processes so OH-PAHs can be rapidly degraded in soils¹³. They constitute a group of organic pollutants of interest, not for their persistence in the environment but for their higher toxicity than the native PAHs and for their use as possible biomarkers to determine total exposure to PAHs¹⁴.

OH-PAHs have been studied in different matrices, particularly in liquid matrices and biological fluids, but they have been less studied in solid environmental matrices such as soils or sediments. They have been analyzed through multiple techniques, like in urine or sediments by HPLC/FLD or HPLC/MS^{15,16,17,18}, and in soils, water, fish and sediments by GC/MS^{19,20,21,22} or capillary electrophoresis coupled to fluorescence detection (CE/FLD)^{23,24}.

^aCentre Grup de Tècniques de Separació en Química (GTS), Edifici CN, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain.

*E-mail: Montserrat.lopez.mesas@uab.cat; Tel: +34 93 581 49 38

^bUMR 6014 COBRA, Université de Rouen, 55 Rue Saint Germain, 27000 Évreux, France.

On the other hand, molecularly imprinted polymers (MIPs) have also been the focus of many researchers in the recent years because of their unique separation potential. MIPs are highly cross-linked polymeric phases, able to recognize the shape and functional groups of a molecule or structurally related molecules. In particular, solid phase extraction (SPE) based on MIPs combines selectivity and robustness, thanks to the affinity of the analytes towards the modified stationary phase with the print. Retention occurs by molecular recognition, and not by conventional polarity or dipole interactions. MIPs have already been successfully used in food analysis²⁵, biological samples like urine²⁶, water matrices²⁷, etc. In soils, other less selective SPE cleanup procedures have been applied by some authors, such as SPE silica²⁸ or C18²⁹, as well as column chromatography based on silica gel³⁰.

The objective of this work is to establish a new method for OH-PAHs analysis, comparing it with a common one. The new analytical method introduces the use of molecularly imprinted polymers (MIPs) for the selective clean-up of OH-PAHs in soils, after their microwave assisted extraction (MAE) and followed by HPLC/FLD separation and detection. The other method consists in the traditional silylation of the hydroxylated compounds¹⁹ extracted by MAE and the final GC/MS analysis.

2 Experimental

2.1 Chemicals

Acetonitrile, toluene, methylene chloride, chloroform, acetone, tetrahydrofuran (THF), methanol, ethanol (all of HPLC grade) and acetic acid (99.5 %) were obtained from Fisher Scientific France (Illkirsh, France). N,O-Bis (trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA), hydrochloric acid, trifluoroacetic acid (TFA), formic acid and sodium hydroxide were from Sigma-Aldrich France (Saint Quentin Fallavier, France). Water was purified and deionised using a Direct Q3 system from Millipore France (Molsheim, France). Seven PAHs were used to spike soils in microcosms: phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene, benzo[k]fluoranthene and benzo[g,h,i]perylene, all purchased from Sigma-Aldrich France. Two stock solutions, one containing phenanthrene alone or a mixture of the seven PAHs, were prepared in acetone for soils spiking procedures.

Three representative OH-PAHs with two, three and four aromatic rings, 2-naphthol (2-OHNaph), 9-phenanthrol (9-OHPhe), 1-hydroxypyrene (1-OHPyr) respectively, were selected in order to cover a wide range of different OH-PAHs for parameters optimization of MAE and MIPs steps. After preliminary results from the collected soil analysis, the PAH fluorene was observed, so its metabolite 2-hydroxyfluorene (2-OHFlu) was later incorporated to the study. For HPLC/FLD quantitative analysis and soils spiking procedures, the selected OH-PAHs, from Sigma-Aldrich (France), were prepared in acetonitrile (25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). For GC/MS, a working stock solution of OH-PAHs was prepared from individual standards diluted with toluene (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and perdeuterated phenanthrene (Phe- d_{10}), purchased from Sigma-Aldrich (France), was used as internal standard (100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ in toluene).

2.2 Preparation of soil samples

Soil samples were collected in autumn 2011 from a long-term grassland experimental field site (a rye-grass clover monoculture with permanent cover and no tillage for 25 years) located in

Yvetot (Upper-Normandy, France). The soil, representative of the Paris Basin, is classified as silty (e.g. loess) soil containing 15 % clay, 65 % silt, and 20 % sand. The soil is a Luvisol, according to the classification of the World Reference Base for soil resource (WRB), endorsed by the Union of Soil Science (IUSS). The pH is 5.70 and the total organic content (TOC) is 2.1 %. Field-moist soils were sieved to 2 mm particle size and stored at 20 °C during one week (under humidity control). Ten per cent of the collected soil was sterilized by autoclaving to avoid degradation of OH-PAHs during the development of the analytical method. A fraction of this autoclaved soil was spiked with a mixture of OH-PAHs in order to perform preliminary studies. To do so, the soil was dried one night at 35 °C and softly crushed (for MAE, fine and homogeneous particles are necessary to obtain good and reproducible results). Then, the soil was spiked with the standard solution to reach a final concentration of 0.20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ of each OH-PAH; the spiked soil was mixed one day in the dark, then let one other day before analysis.

For the biodegradation studies, another part of the sterilized soil was dried one night at 35 °C, crushed and separated in two parts. One of the parts was spiked with phenanthrene (30000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) and the other with a mixture of seven PAHs (with a total concentration of 3000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, containing, among others, phenanthrene and pyrene). Dry sterilized soils were mixed under an extractor hood during two days to better distribute PAHs and evaporate acetone. After a week of stabilization, dry sterilized soils enriched with PAHs were mixed with original soil (non-sterilized, preserving its initial biological activity) and homogenized to obtain microcosms. Microcosm (named E1) consisted of 90 g of wet soil (24.8 % vol/wt of water; that is 70 % of water holding capacity) and 10 g of dry sterilized soil enriched with phenanthrene (in order to obtain a final concentration of 3000 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Microcosm (named E2) consisted of 90 g wet soil and 10 g of dry sterilized soil enriched with the mixture of seven PAHs (in order to obtain a final concentration at 300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$). Each microcosm was prepared in triplicate. Incubations were performed in 500 mL sterilized glass flask, hermetically closed and incubated at 20 °C in static mode in a dark room.

2.3 Microwave assisted extraction of OH-PAHs from soil

MAE was performed using a MARS X equipment (CEM Corporation, Matthews, USA). Wet soils from microcosms were previously dried one night at 35 °C and then crushed before extraction. A sample size of 1 g of crushed dry soil was extracted using 25 mL of different organic solvents (methylene chloride, acetonitrile) and some mixtures of solvents (acetonitrile mixed with toluene, hydrochloric acid, sodium hydroxide, tetrahydrofuran, chloroform and acetone) during 30 minutes at different temperatures in the range of 100-140 °C at 1200 W. Then, extracts were filtered through 0.45 μm Phenex Teflon filters (Phenomenex, Le Pecq, France) in order to remove soil particles prior to the analysis.

2.4 Method 1: MAE-MIPs-HPLC/FLD for OH-PAHs analysis

2.4.1 Selective clean-up by molecularly imprinted polymers (MIPs)

After MAE, extracts clean-up was performed by AFFINIMIP@SPE Phenolics solid phase extraction (SPE) cartridges, purchased from PolyIntell (Val de Reuil, France), which are commercial molecularly imprinted polymers for phenolic compounds packed in cartridges. MIPs SPE cartridges were firstly conditioned with 4 mL of toluene and 2 x 4 mL of

acetonitrile, following manufacturer recommendations. Then, 25 mL of the filtered MAE extract were loaded to the SPE cartridges, and the washing step was performed with 4 mL of acetonitrile. Then, the SPE cartridge was gently air-dried, and OH-PAHs were eluted with a mixture of methanol and acids such as acetic acid, TFA or formic acid. The optimum elution volume and elution solvents ratio were evaluated, since this last information was not provided by the manufacturer.

Non-imprinted polymers (NIPs) cartridges, which were the same as MIPs but without the printing pattern, were also used to prove that retention mechanism was due to molecular recognition. NIPs are not commercial products and were specially made and kindly provided by the manufacturer.

2.4.2 HPLC/FLD analysis

After clean-up by MIPs, the analysis by HPLC/FLD was performed with a Beckman System Gold 126 liquid chromatograph (Fullerton, USA), with a sample loop of 20 μ L and a Varian ProStar fluorescence spectrophotometer (Palo Alto, USA). The column used (Envirosep PP from Phenomenex) was a C18 bonded silica phase (150 mm x 4.6 mm x 5 μ m), and the elution was performed at constant flow of 1 mL \cdot min⁻¹ and constant temperature (25 $^{\circ}$ C). The mobile phase was composed of water and acetonitrile and the gradient elution was set as follows: 0-3 min 45 % acetonitrile, 3-10 min linear increase to 100 % acetonitrile. The detector parameters are shown in Table 1. Excitation and emission wavelengths were previously determined using a fluorescence spectrometer from Varian (Cary eclipse).

Table 1. Wavelength program as a function of time used to detect the OH-PAHs by HPLC/FLD.

| Time (min) | λ_{exc} (nm) | λ_{em} (nm) | OH-PAHs | Retention time (min) |
|------------|----------------------|---------------------|----------|----------------------|
| | 222 | 351 | 2-OHNaph | 3.455 |
| 4.0-6.0 | 272 | 326 | 2-OHFlu | 5.368 |
| 6.0-8.0 | 248 | 383 | 9-OHPhe | 6.806 |
| 8.0-13.0 | 240 | 286 | 1-OHPyr | 8.663 |

2.5 Method 2: MAE-silylation-GC/MS for OH-PAHs analysis

2.5.1 Silylation

After MAE and filtration steps, it was necessary to perform a derivatization of the hydroxyl groups of the OH-PAHs, via silylation, prior to their analysis by GC/MS, in order to improve their chromatographic performance, sensitivity, and thermal stability. The method was adapted from a previous work¹⁹, removing the purification step (the analysis of blanks revealed no important matrix effects in comparison with standard calibration curves). To do so, the extract was concentrated by evaporation to 1-2 mL. After that, 10 μ L of perdeuterated phenanthrene internal standard (100 μ g \cdot mL⁻¹) and 50 μ L of the derivatization agent, N,O-Bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA), were added to 940 μ L of the liquid extract and placed in a silicone bath at 60 $^{\circ}$ C for 30 min, under constant stirring to complete the silylation process.

2.5.2 GC/MS analysis

After silylation, 1 μ L of the sample was injected (pulsed splitless injection at 280 $^{\circ}$ C) in a gas chromatographer (model 6850) coupled to a mass spectrometer (model 5975C) from Agilent Technologies (Santa Clara, USA). The column was a J&W, HP-

5MS poly(phenylmethyl)siloxane (50 m x 0.25 mm x 0.25 μ m). The oven program started at 55 $^{\circ}$ C (1 min) to 180 $^{\circ}$ C (at 40 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹) followed by an increase to 300 $^{\circ}$ C (at 4.3 $^{\circ}$ C \cdot min⁻¹), under a constant carrier gas flow of 1.3 mL \cdot min⁻¹. Ionization source temperature was set at 280 $^{\circ}$ C and the transfer line at 300 $^{\circ}$ C. The detection of the analytes was conducted in selected ion monitoring (SIM), with the selected masses shown in Table 2.

2.6 Quality Assurance and Quality control (QA/QC)

Control samples were used to evaluate analysis performance. Standard solutions were analyzed between soil samples to verify that calibration curves were valid throughout the analysis and that the instrument was not affected by the matrix of the samples (Continuing Calibration Verification, CVV). Moreover, in the case of the GC/MS, an internal standard was used (Perdeuterated phenanthrene, Phe-d₁₀). In both cases, recoveries of the compounds from the standard solutions were accepted within 80-120 % of the nominal concentrations. Furthermore, one blank was also included for each different microcosm evaluated, which consisted in the analysis of the non-spiked sterile soil, to control contamination resulting on the sample preparation and the whole analytical procedure. Intra-laboratory reproducibility was also studied on five different samples (carried out by the same person and analyzed at different days).

Table 2. Masses of ion selected monitoring (SIM) for the analysis of OH-PAHs by GC/MS.

| Time (min) | Mass of OH-PAHs | Corresponding OH-PAHs |
|------------|--------------------|---|
| 0.0-6.5 | Solvent delay | |
| 6.5-12.0 | 188, 216, 254, 304 | Perdeuterated phenanthrene, silylated naphthols, silylated fluorenols, disilylated naphthalenediols |
| 12.0-14.0 | 254, 342 | Silylated hydroxyfluorenes and disilylated hydroxyfluorenediols |
| 14.0-20.0 | 266, 354 | Silylated phenanthrols and disilylated phenanthrenediols |
| 20.0-25.0 | 290, 340, 378 | Silylated hydroxypyrenes, silylated hydroxybenz [a]pyrenes and disilylated hydroxypyrenediols |

3 Results and discussion

The development of a new method for the analysis of OH-PAHs in soils was realized in several steps, one for the microwave assisted extraction, one for the MIPs SPE clean-up, the latter for the chromatographic separation and detection.

To study the natural biodegradation of PAHs, microcosms were prepared by spiking Yvetot soil with PAHs, as indicated.

3.1 Optimization of MAE: Choice of the extraction solvents and temperature

Ten solvents or mixtures of solvents (see Fig. 1) were tested in order to obtain the conditions needed to achieve the highest recovery percentages for the target OH-PAHs. All the extractions were carried out using a total volume of 25 mL at 120 $^{\circ}$ C for 30 minutes to obtain comparable results. Then, the extracts were purified by MIPs using 6 mL of methanol:acetic acid (98:2) as an

elution solvent and analyzed by HPLC/FLD. Important variations were observed on the recoveries for all the OH-PAHs, because of the weak extraction capacity of some of the solvents and because some of them were probably not compatible with the polymer composing the MIPs. Acetonitrile and some of its combinations with different percentages of toluene and acetone were the most effective extraction solvents. The acidification or addition of base, such as HCl and NaOH respectively, or the use of THF (which certainly contributed to swell the polymer, changing the volume of the recognizing cavities) showed only small recoveries for 2-OHNaph; therefore they were not a good choice as solvents for the present purpose.

It can be observed that increasing the volume of toluene added to the acetonitrile allowed a better recovery for 9-OHPhe in opposition to a regular decrease for 2-OHNaph. The best compromise for the extraction solvent by MAE was found when using pure acetonitrile or acetonitrile with 10 % of toluene; no significant increase of recovery percentages for 1-OHPyr could be observed when adding 25 or 50 % of toluene in acetonitrile.

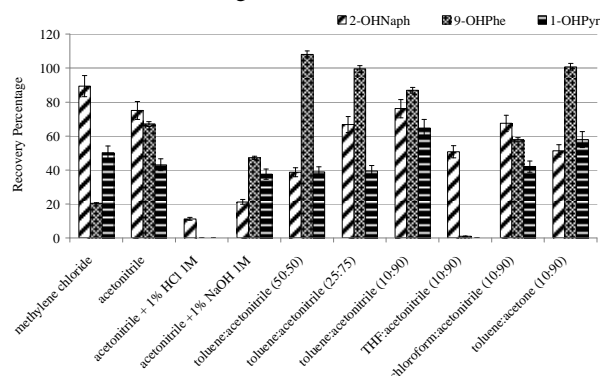


Fig. 1 Recovery Percentage of 2-naphthol (2-OHNaph), 9-phenanthrol (9-OHPhe) and 1-hydroxypyrene (1-OHPyr) as a function of the extraction solvent used in the microwave assisted extraction (MAE). Error bars indicate the standard deviation of replicates (n=3).

To optimize the extraction temperature, three extractions with 25 mL of pure acetonitrile as extraction solvent were performed at different temperatures (100 °C, 120 °C, 140 °C) for 30 minutes, followed by MIPs clean-up (as indicated above) prior to HPLC/FLD analysis. A maximum of 30 minutes was chosen for MAE extraction because previous tests on extraction of PAHs from solid environmental matrices, particularly difficult to extract, showed that the optimal time was about thirty minutes⁸. As can be seen in Fig. 2, the extraction was better as temperature increased for 1-OHPyr (the highest molecular weight OH-PAH and also the most difficult to extract). For 2-OHNaph, a significant decrease in the recovery percentages was observed as temperature increased, probably as a consequence of thermal degradation. Finally, for 9-OHPhe, the extraction at the three levels of temperature was quite similar. Hence, 120 °C was chosen as the compromise temperature for MAE extractions of OH-PAHs.

3.2 Optimization of MIPs clean-up: Choice of the elution solvent and volume

To evaluate which was the best eluting solvent mixture for the MIPs clean-up procedure, the extraction of 1 g of soil spiked with 0.20 mg·kg⁻¹ of the three selected OH-PAHs was performed by MAE, using 25 mL of pure acetonitrile at 120 °C for 30 minutes. After that, MIPs clean-up was performed and the elution step was

carried out with 5 mL of the different solvents mixtures tested. Finally, the purified extracts were analyzed by HPLC/FLD.

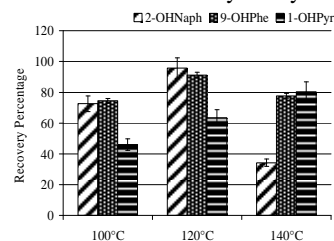


Fig. 2 Recovery Percentage of 2-naphthol (2-OHNaph), 9-phenanthrol (9-OHPhe) and 1-hydroxypyrene (1-OHPyr) as a function of three temperatures (100 °C, 120 °C and 140 °C) used in the microwave assisted extraction (MAE). Error bars indicate the standard deviation of replicates (n=3).

Corresponding results are shown in Fig. 3, where recovery percentages of the OH-PAHs when methanol (with or without different percentages of acetic, formic and trifluoroacetic acid) or ethanol (with a 2 % acetic acid) were used as elution solvents for MIPs SPE clean-up. Better recoveries were generally obtained for 2-OHNaph, followed by 9-OHPhe and 1-OHPyr for each tests. According to the manufacturer information, these commercial MIPs were developed for extracting phenolic compounds and the recognizing cavities were imprinted using a phenolic template with only one aromatic ring. Therefore, a decrease of the capacity to retain the compounds as the number of fused rings increases can be explained. Methanol without any acid was less efficient for eluting OH-PAHs: acids are necessary for breaking hydrogen bonds between the imprinted cavity and hydroxyl functional groups of OH-PAHs. Ethanol was also less efficient than methanol, probably because of its weaker polarity. There were three combinations which produced similar results (methanol with a 2 % of acetic acid and the two combinations studied with formic acid). However, it seems that methanol with a 2 % of acetic acid mixture was the optimum combination for the elution of the OH-PAHs.

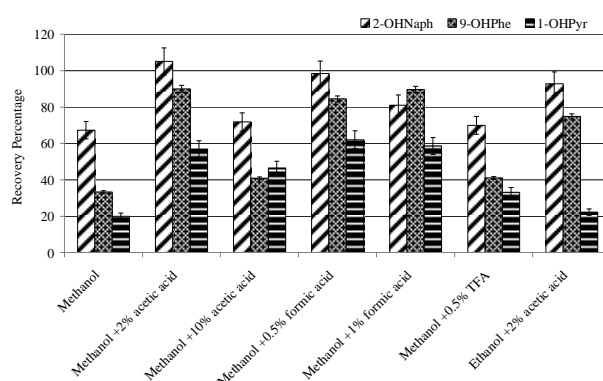


Fig. 3 Recovery Percentage of 2-naphthol (2-OHNaph), 9-phenanthrol (9-OHPhe) and 1-hydroxypyrene (1-OHPyr) after clean-up by MIPs with 5 mL of different elution solvents. Error bars indicate the standard deviation of replicates (n=3).

The volume of elution solvent was then investigated for the elution mixture containing methanol with a 2 % of acetic acid. As can be seen in Fig. 4, the higher the volume used, the greater the recovery was, particularly for 1-OHPyr which is certainly the most difficult to desorb. For 9-OHPhe, it seems that the optimum

solvent volume was around 4 mL, and for 2-OHNaph, the maximum was observed between 5 and 6 mL. Therefore, the selected compromise volume was 6 mL of methanol with a 2 % of acetic acid.

3.3 Selectivity of MIPs

To study the selectivity of MIPs clean-up, a sample of soil spiked with PAHs and four OH-PAHs was processed following the optimized MAE-MIPs-HPLC/FLD procedure. Typical chromatograms are shown in Fig. 5. In Fig. 5(a), the chromatogram was obtained after the optimized MAE extraction, filtration and direct injection into the chromatographic system (without any purification step). Several peaks are observed, the first four corresponding to the OH-PAHs of interest and the rest being the PAHs (only three of the seven spiked native PAHs appear in this chromatogram because the detection wavelengths

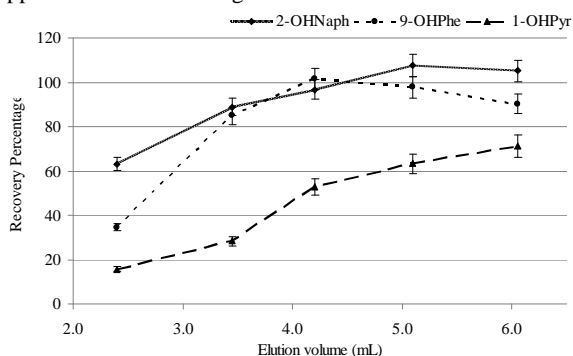


Fig. 4 Recovery Percentage of 2-naphthol (2-OHNaph), 9-phenanthrol (9-OHPhe) and 1-hydroxypyrene (1-OHPyr) after clean-up by MIPs with methanol:acetic acid (98:2) as a function of the amount of elution volume used. Error bars indicate the standard deviation of replicates (n=3).

and mobile phase elution programs were not optimized for native PAHs). In Fig. 5(b), a sample of the same soil was purified by MIPs after MAE. As can be seen, the selectivity towards the four OH-PAHs under study is high. PAHs are slightly or not retained in the MIPs phase and only OH-PAHs are retained and later eluted. Finally, Fig. 5(c) shows the chromatogram after the use of NIPs instead of MIPs (non imprinted polymer, which is the same polymer but without the molecular imprinted pattern). This figure shows no peaks at all, proving that nothing was retained in the SPE cartridge, which explains that retention occurs by molecular recognition, and not by polar or dipole-like interactions with the polymer. Moreover, important differences on the fluorescence intensity during this MIPs clean-up process can be seen, meaning that a concentration step of approximately four times is also occurring when using MIPs for OH-PAHs determination by HPLC/FLD. It can be noticed that if lower limits of detection (LOD) and limits of quantification (LOQ) are needed in the MAE-MIPs-HPLC/FLD procedure, they could be improved using a solvent evaporation step after the MIPs clean-up and prior to the HPLC/FLD analysis.

3.4 Methods performance

The good performance of the MAE-MIPs-HPLC/FLD method was evaluated and compared to a common method used to analyze hydroxylated compounds by GC/MS.

For the MAE step, the extraction solvent mixture acetonitrile:toluene (90:10) was chosen since recovery percentages for 1-OHPyr was much better with the combination of these two organic solvents, as mentioned before (section 3.1).

In Table 3, the linear regression parameters and total recovery percentages obtained for the four OH-PAHs under study are presented for both methods. LODs were determined based on signal-to-noise ratio. It was performed by comparing measured signals from samples with known low concentrations of analyte with baseline signal and establishing the minimum concentration at which the analyte can be reliably detected. A signal-to-noise ratio of 3 was the considered acceptable for estimating the detection limits. LOQs were considered acceptable with a signal-to-noise ratio of 10. Furthermore, LODs and LOQs ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) were calculated multiplying instrumental technique LODs and LOQs ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) by solvent extracting volume (25 mL), dividing by sample weight (1 g) and correcting by Mean Recovery Percentages.

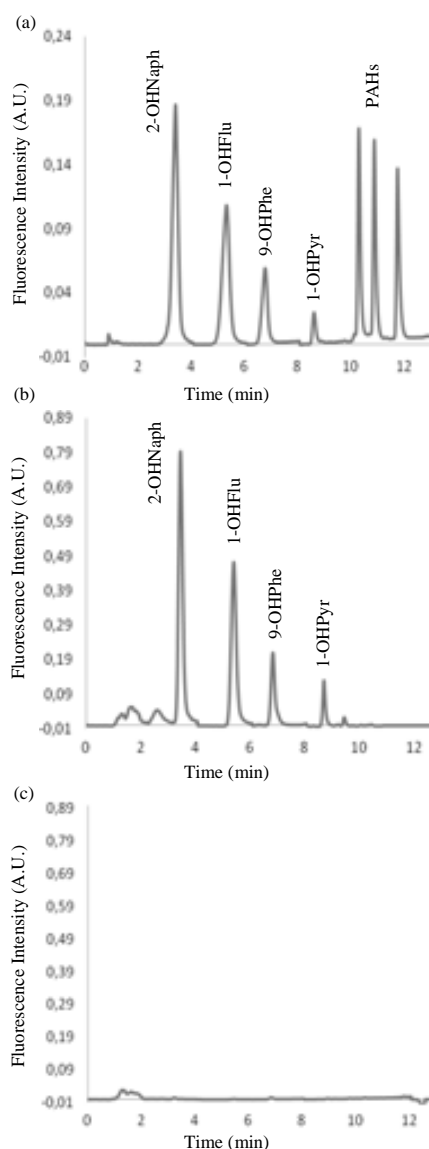


Fig. 5 Chromatograms obtained after MAE extraction of spiked soil (PAHs + OH-PAHs) a) without clean-up of the extract b) extract purified by MIPs (with a concentration factor of 4) c) extract percolated through NIPs.

Table 3. Regression parameters obtained for the calibration and total recoveries of the OH-PAHs for the MAE-MIPs-HPLC/FLD and MAE-silylation-GC/MS methods.

| Analytical methods | OH-PAHs | y = ax + b | | r ² | Linear range (µg·mL ⁻¹) | Mean Recovery Percentages (%; mean ± SD, n=5) | LOD ^a (µg·g ⁻¹) | LOQ ^a (µg·g ⁻¹) | RSD (%) |
|----------------------|----------|------------|-----------------|----------------|-------------------------------------|---|--|--|---------|
| | | Slope (a) | y-intercept (b) | | | | | | |
| MAE-MIPs-HPLC/FLD | 2-OHNaph | 378793426 | 298987 | 0.9985 | 0.002-0.050 | 79 ± 5 | 0.003 | 0.010 | 7 |
| | 2-OHFlu | 240812681 | 289220 | 0.9978 | 0.002-0.100 | 93 ± 6 | 0.003 | 0.011 | 6 |
| | 9-OHPhe | 79392097 | - 83629 | 0.9985 | 0.002-0.100 | 89 ± 2 | 0.007 | 0.023 | 2 |
| | 1-OHPyr | 44765673 | -29832 | 0.9666 | 0.002-0.100 | 68 ± 6 | 0.014 | 0.044 | 8 |
| MAE-silylation-GC/MS | 2-OHNaph | 0.6385 | - 0.0205 | 0.9994 | 0.200-4.000 | 88 ± 3 | 0.213 | 0.703 | 4 |
| | 2-OHFlu | 0.7424 | - 0.0397 | 0.9988 | 0.200-4.000 | 99 ± 3 | 0.047 | 0.155 | 3 |
| | 9-OHPhe | 0.6017 | - 0.0601 | 0.9988 | 0.200-4.000 | 70 ± 1 | 0.110 | 0.363 | 2 |
| | 1-OHPyr | 0.6495 | - 0.0702 | 0.9954 | 0.200-4.000 | 104 ± 6 | 0.139 | 0.459 | 6 |

^a LODs and LOQs (µg·g⁻¹) were calculated multiplying instrumental technique LODs and LOQs (µg·mL⁻¹) by solvent extracting volume (25 mL), dividing by sample weight (1 g), correcting by Mean Recovery Percentages.

Comparing the advantages and disadvantages of the two methods, it can be seen (Table 3) that total recoveries and relative standard deviations (RSD %) are slightly better by MAE-silylation-GC/MS. Nevertheless, recoveries of soil spiked with OH-PAHs by the new proposed method, MAE-MIPs-HPLC/FLD ranged between 68-93 %. Other described methodologies to analyze OH-PAHs which include ultrasonic or liquid-liquid extraction, SPE, SPME, derivatization, GC/MS (in particulate matter, water, urine and other biological matrices) presented lower recoveries, 36-87 %^{30,31,18,32,33} while in soils by GC/FID and HPLC/DAD similar recoveries were found²⁸ at the same or higher spike levels. On the other hand, RSD values of OH-PAHs analysis in soil and sediments samples found in the bibliography are similar (3-11 %)²⁹ or higher (9-41 %)³⁰ than those obtained by MAE-MIPs-HPLC/FLD (2-8 %).

LODs and LOQs were an order of magnitude better when using MAE-MIPs-HPLC/FLD compared to MAE-silylation-GC/MS. LODs of the new proposed method ranged between 0.003-0.014 µg·g⁻¹, which are comparable to other published methods for OH-PAHs analysis in soils (0.420 µg·g⁻¹ for 2-OHNaph²⁸, 3 OH-PAHs ranging between 0.1-0.3 ng·g⁻¹³⁰ and 8 OH-PAHs between 0.0139-0.2334 ng·g⁻¹²⁹). LODs and LOQs of MAE-MIPs-HPLC/FLD can also be lowered to 0.25-1.2 ng·g⁻¹ by concentrating the 6 mL eluted from SPE MIPs to 0.5 mL (or less) before the analysis.

It is also interesting to observe that the total time required for the analysis of one sample was shorter by MAE-MIPs-HPLC/FLD. Indeed, in this method, the SPE clean-up step consumed 10 minutes per sample and it could be reduced if it was carried out on a vacuum manifold by doing all the samples at the same time. In MAE-silylation-GC/MS, the silylation step lasted 30 minutes. OH-PAHs are generally completely converted to their silyl-derivatives in less than one hour at 60 °C with BSTFA. Three derivatization times were tested: 30, 45 and 60 minutes, which gave the same results. Therefore, the reaction time was lowered to 30 minutes without any significant changes on the quantification of the four target OH-PAHs. But this derivatization step remains long. While sample pretreatment by MAE-MIPs-HPLC/FLD is accomplished in less than 50 min, other reported methods require more time (from 70 minutes to 7.5 hours)^{28,29,30}. Moreover, the chromatographic analysis by the first method (HPLC/FLD) was performed in 10 minutes, while 25 minutes were necessary to complete the analysis by the second one (GC/MS).

Related to interferences, chromatograms obtained for the MAE-MIPs-HPLC/FLD procedure showed less interference, thanks to the use of MIPs SPE cartridges as a selective clean-up step. In MAE-silylation-GC/MS analytical procedure, the presence of interferences was higher because no purification step was involved in it. Also, some authors noticed possible interferences of humic and fulvic acids (coextracted from soil) with the derivatization of the analytes of interest³⁰, which is avoided in MAE-MIPs-HPLC/FLD.

Finally, in terms of solvent consumption, MAE-silylation-GC/MS analytical procedure was clearly environmentally safer. The amount of solvent consumed was low, essentially on the MAE extraction step, unlike MAE-MIPs-HPLC/FLD procedure, where MIPs SPE step and the analysis by HPLC/FLD required higher amounts of organic solvents.

3.5 Application to soil biodegradation studies

As previously described in section 2.2, two microcosms were prepared and analyzed by both methods. Before starting the analysis of both soils, blanks were acquired to control background pollution in Yvetot soil, which did not exceed 0.6 mg kg⁻¹ for the total of the sixteen priority PAHs (defined by the US environmental protection agency).

3.5.1 Hydroxy-phenanthrene in microcosm E1

OH-PAHs are transitional metabolites which appear generally early in the PAHs biodegradation process by microorganisms and which can be converted fast into other oxygenated metabolites. After 7 days of the incubation of the microcosm, an aliquot of the soil was dried, crushed and extracted by the MAE procedure and analyzed by both methods. When using MAE-MIPs-HPLC/FLD procedure, the concentration of 9-OHPhe was found to be 2.50 µg·L⁻¹ in the 25 mL MAE extract, corresponding to 63 ng·g⁻¹ in the soil. This value indicates that hydroxylated metabolites can be found at very low trace levels in soils and that, efficient analytical tools have to be performed to quantify them in the environment. Fig. 6 shows a chromatogram where three main peaks can be seen between 6 and 8 minutes, one assigned to 9-OHPhe (thanks to its retention time compared to the standard), and the other two peaks possibly corresponding to other monohydroxylated derivatives of phenanthrene (positional isomers are more likely than dihydroxylated derivatives because they have fluorescence

wavelengths characteristics nearer to 9-OHPhe than polyhydroxylated metabolites). It can be noticed in Fig. 6 that native phenanthrene could be also detected in spite of the selective purification step. It is known by the manufacturer that less than 1 % of PAHs are extracted by MIPs due to non-selective hydrophobic interactions because of the nature of the imprinted polymer. Keeping in mind that the initial concentration of phenanthrene was $3000 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, residual phenanthrene was retained on MIPs.

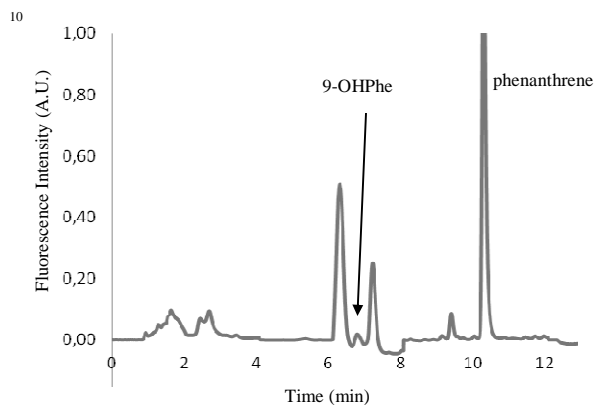


Fig. 6 Chromatogram of microcosm E1 following the whole MAE-MIPs-HPLC/FLD analytical procedure.

On the other hand, Fig. 7 shows the chromatogram obtained after MAE-silylation-GC/MS analytical procedure, where multiple peaks are observed, some of them corresponding to hydroxylated derivatives, including 9-OHPhe (as indicated) and others to silylation residues or soil matrix interferences. Nevertheless, the concentration of 9-OHPhe was found below its quantification limit.

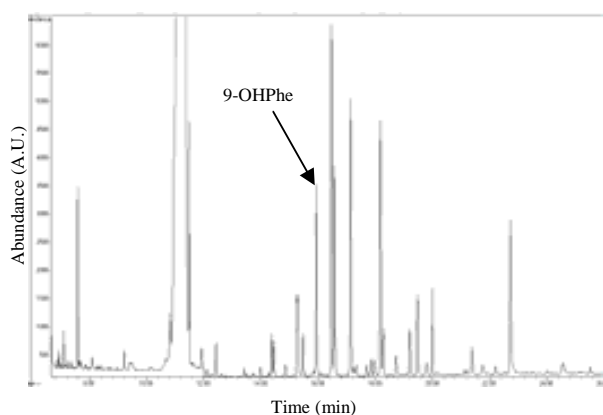


Fig. 7 Chromatogram of microcosm E1 following the whole MAE-silylation-GC/MS analytical procedure.

Microcosm E1 was again analyzed after 21 days of incubation, following the first method and obtaining now a value of $5.60 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the 25 mL MAE extract for 9-OHPhe, corresponding to $140 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ in the soil. Thus, phenanthrene was still degraded by endogen microorganisms of the soil after three weeks of incubation.

Both methods demonstrated to be useful to detect PAHs hydroxylated derivatives of interest but only the MAE-MIPs-HPLC/FLD analytical procedure was useful to give a quantitative value for 9-OHPhe.

3.5.2 Hydroxylated metabolites in microcosm E2

Analogously to microcosm E1, the analysis of the E2 microcosm was performed after one week of incubation to follow the selected OH-PAHs metabolites. By the MAE-MIPs-HPLC/FLD analytical procedure, only two of the compounds were observed, 9-OHPhe and 1-OHPyr. The last one was identified but was found below its quantification limit, and only 9-OHPhe was successfully quantified after 7 days at $6.00 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in 25 mL MAE extract, corresponding to $150 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ in the soil. Hydroxylated naphthalene and fluorene could not be detected because they were not in the mixture of the seven spiked PAHs. The concentration of 9-OHPhe was two times greater in the microcosm E2 than that found in the microcosm E1, even if phenanthrene was spiked at higher concentration in microcosm E1 (70 times higher in microcosm E1 than in microcosm E2). We can suppose that the very high level of pollution introduced in the first microcosm may have toxic effects on the microorganisms, which are the responsible of the PAHs degradation, so phenanthrene degradation was slower. A high dose of PAHs in a substrate may affect the activity/rate of microbial degradation. Verrhiest et al. established that PAH dose has no effect on the microbial community in sediments up to a range of $30 \text{ mg PAH}\cdot\text{kg}^{-1}$. The PAHs had an effect at higher concentrations owing to partial inhibition of some enzyme activity³⁴.

Nevertheless, how microorganisms degrade PAHs in water, soil or sediment, depends on the enzymatic adaptation in response to long exposure to aromatic hydrocarbons, and the impact of a not chronic but considerable exposure is still under determination³⁵. In microcosm E2, after 21 days of incubation, the concentration of 9-OHPhe found by MAE-MIPs-HPLC/FLD was $7.10 \text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ in the 25 mL MAE extract, corresponding to $178 \text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ in the soil. Fig. 8 shows the chromatogram of E2 analysis by MAE-MIPs-HPLC/FLD.

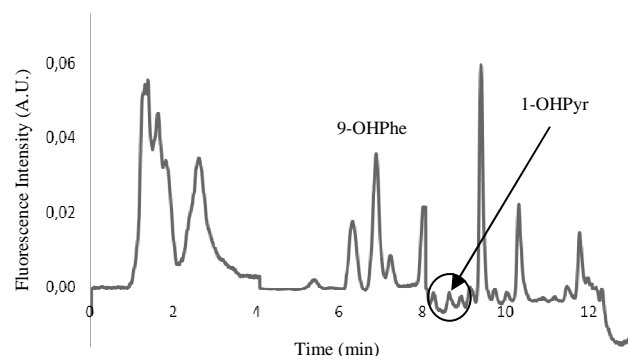


Fig. 8 Chromatogram of microcosm E2 following the whole MAE-MIPs-HPLC/FLD analytical procedure.

By MAE-silylation-GC/MS procedure, only 9-OHPhe could be detected among all the interference peaks, like for microcosm E1, but was present below its quantification limit.

4 Conclusions

A new analytical procedure for the analysis of OH-PAHs in complex solid matrices has been successfully developed and applied. The optimization of several parameters of the extraction, cleanup and chromatographic analysis allowed to obtain good limits of detection and quantification, high recoveries and great reproducibility. MAE-MIPs-HPLC/FLD proved to be suitable for the identification and quantification of some PAHs hydroxylated

metabolites in microcosms, avoiding the tedious silylation procedure. Furthermore, the use of MIPs demonstrated to be a quick, efficient, selective clean-up and pre-concentration step which allowed the analysis of hydroxylated derivatives without the interference of the original PAHs or the soil matrix, which is particularly required for the quantification of trace levels in complex matrices. The new proposed method is simple and fast in terms of sample preparation and shows high sensitivity for the compounds studied. Therefore, it could be successfully used to analyze hydroxylated polycyclic aromatic hydrocarbons in polluted soils.

Acknowledgements

Authors acknowledge the financial support provided by Spanish Ministry MICINN (CTQ2009-07432) and MINECO (CTM2012-30970). O. Baltrons acknowledges the research support by Universitat Autònoma de Barcelona (P.I.F. Grant 403-03-1/09) and also travel grant to France (Grant ESTPIF2011-03). The authors thank L. Klosek for her contribution to the work.

References

- 1 ATSDR Agency for Toxic Substances & Disease Registry. Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): What are Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)? <http://www.atsdr.cdc.gov/>
- 2 E. Morillo, A. S. Romero, C. Maqueta, L. Madrid, F. Ajmone-Marsan, H. German, C. M. Davidson, A. S. Hursthouse, J. Villaverde, *J. Environ. Monit.*, 2007, **9**, 1001-1008.
- 3 Md. Yeakub Ali, R. B. Cole, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2002, **374**, 923-931.
- 4 A. Hubert, P. Popp, K. D. Wenzel, W. Engewald, G. Schüürmann, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, **376**, 53-60.
- 5 A. Zouir, F. A. Esteve-Turrillas, T. Chafik, A. Morales-Rubio, M. De la Guardia, *Soil and Sediment Contam.*, 2009, **18**, 535-545.
- 6 R. Quiroz, J. O. Grimalt, P. Fernandez, L. Camarero, J. Catalan, E. Stuchlik, H. Thies, U. Nickus, *Water Air Soil Pollut.*, 2011, **215**, 655-666.
- 7 F. Portet-Koltalo, K. Oukebdane, L. Robin, F. Dionnet, P. L. Desbène, *Talanta*, 2007, **71**, 1825-1833.
- 8 F. Portet-Koltalo, K. Oukebdane, F. Dionnet, P. L. Desbène, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, **390**, 389-398.
- 9 M. A. Siddiqi, Z. X. Yuan, S. A. Honey, S. Kumar, H. C. Sikka, *Polycycl. Aromat. Comp.*, 2002, **22**, 621-630.
- 10 K. Watanabe, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001, **12**, 237-241.
- 11 K. S. Samanta, O. V. Singh and R. K. Jain, *Trends Biotechnol.*, 2002, **20**, 243-248.
- 12 D. Boyle, C. Wiesner, A. Richardson, *Soil. Biol. Biochem.*, 1998, **30**, 873-882.
- 13 S. Lundstedt, *Analysis of PAHs and their transformation products in contaminated soil and remedial processes*, Solfjäden Offset AB, Sweden, 2003.
- 14 E. Elovaara, V. Väänänen, J. Mikkola, *Arch. Toxicol.*, 2003, **77**, 183-193.
- 15 St. Ferrari, F. Mandel, J. D. Berset, *Chemosphere*, 2002, **47**, 173-182.
- 16 Z. Li, L. C. Romanoff, D. A. Trinidad, N. Hussain, R. S. Jones, E. N. Porter, D. G. Patterson Jr., A. Sjödin, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 5744-5751.
- 17 P. Jacob, M. Wilson, N. L. Benowitz, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 587-598.
- 18 J. Blahova, K. Kruzikova, B. Kasiková, P. Stierand, J. Jurcikova, T. Ocelka, Z. Svobodova, *Sensors*, 2010, **10**, 203-217.
- 19 T. Luan, S. Fang, Y. Zhong, L. Lin, S. M. N. Chan, C. Lan, N. F. Y. Tam, *J. Chromatogr. A*, 2007, **1173**, 37-43.
- 20 K. Li, L. A. Woodward, A. E. Karu, Q. X. Li, *Anal. Chim. Acta*, 2000, **419**, 1-8.
- 21 B. Johnson-Restrepo, J. Olivero-Verbel, S. Lu, J. Guette-Fernández, R. Baldiris-Avila, I. O'Byrne-Hoyos, K. M. Aldous, R. Addink, K. Kannan, *Environ. Pollut.*, 2008, **151**, 452-459.
- 22 S. Lundstedt, P. Haglund, L. Öberg, *Anal. Chem.*, 2006, **78**, 2993-3000.
- 23 C. J. Smith, J. Grainger, D. G. Patterson, *J. Chromatogr. A*, 1998, **803**, 241-247.
- 24 X. Xu, R. J. Hurtubise, *J. Chromatogr. A*, 1999, **829**, 289-299.
- 25 W. H. Ali, D. Derrien, F. Alix, C. Pérollier, O. Lépine, S. Bayouhd, F. Chapuis-Hugon, V. Pichon, *J. Chromatogr. A*, 2010, **1217**, 6668-6673.
- 26 B. Claude, P. Morin, S. Bayouhd, J. de Ceaurriz, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1196**, 81-88.
- 27 P. Lucci, O. Núñez, M. T. Galceran, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 4828-4833.
- 28 S. Meyer, S. Cartellieri, H. Steinhart, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 4023-4029.
- 29 X. Wang, L. Lin, T. Luan, L. Yang, N. F. Y. Tam, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **753**, 57-63.
- 30 B. A. M. Bandowe, W. Wilcke, *J. Environ. Qual.*, 2010, **39**, 1349-1358.
- 31 A. I. Barrado, S. Garcia, Y. Castrillejo, R. M. Perez, *Atmos. Poll. Res.*, 2012, **3**, 81-87.
- 32 L.C. A. Amorim, J. M. Dimandja, Z. L. Cardeal, *J. Chromatogr. A*, 2009, **1216**, 2900-2904.
- 33 N. Grova, F. Monteau, B. Le Bizec, C. Feidt, F. Andre, G. Rychen, *J. Anal. Toxicol.*, 2005, **20**, 175-181.
- 34 G. J. Verriest, B. Clement, B. Volat, B. Montuelle, Y. Perroddin, *Chemosphere*, 2002, **46**, 187-196.
- 35 E. Sepic, M. Bricelj, H. Leskovsek, *Chemosphere*, 2003, **52**, 1125-1133.

ANNEX 11

INFLUENCE OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF HEAVY METALS ON PAHs BIODEGRADATION

Oriol Baltrons, Mercè Vilaseca, Carmen Gutiérrez, Franck Le Derf, Florence Portet-Koltalo, Montserrat

López-Mesas, Cristina Palet

“to be submitted”

Cite this: DOI: 10.1039/c0xx00000x

www.rsc.org/xxxxxx

ARTICLE TYPE

Influence of different concentrations of heavy metals on PAHs biodegradation

Oriol Baltrons^a, Mercè Vilaseca^b, Carmen Gutiérrez^b, Franck Le Derf^c, Florence Portet-Koltalo^c, Montserrat López-Mesas^{*a}, Cristina Palet^a

⁵ Received (in XXX, XXX) Xth XXXXXXXXXX 20XX, Accepted Xth XXXXXXXXXX 20XX

DOI: 10.1039/b000000x

An experiment to assess the effect of mixed pollutants was carried out to study the influence of different concentrations of heavy metals on the degradation of some PAHs by soil bacterial communities along two months. To do so, groups of microcosms' build of a natural soil sample from the region of Sabadell
10 (Catalonia) were prepared as a reproduction of the native environment at laboratory scale. Mixtures of PAHs and heavy metals were carefully selected according to soil characterization and microbiological growth preliminary assays and were added to microcosms. These microcosms, prepared under controlled experimental conditions, were analyzed at different times showing that there is a significant influence of heavy metals concentration on PAHs biodegradation as a result of their interaction in this complex
15 solid matrix. As a general observation, the higher the concentration of heavy metals, the lower the biodegradation of PAHs of 3-4 rings (Phe, Fluo and Pyr). On the other hand, no important effect on biodegradation of higher molecular weight PAHs (BbF and BaP) was observed at the different levels of heavy metals studied.

50

20

1 Introduction

Soils are very complex solid matrices with very different physicochemical properties, in which multiple kind of pollutants
25 can be found (heavy metals, excess of nutrients, organic compounds such as PAHs or PCBs, etc.) as a result of natural decomposition and anthropogenic activities. This can seriously cause an impact on soil biodiversity (microorganisms, animals, vegetation) and chemodiversity. Therefore, the study of mixed
30 pollutants in the environment is of high interest to assess the possible impact on ecosystems and to contribute with new information which could be useful for the improvement of bioremediation activities in contaminated zones

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are a wide group
35 of organic pollutants produced by the incomplete combustion of organic matter at high temperatures and pressures¹. Their carcinogenic and mutagenic characteristics have attracted the attention of the scientific community. They are constituted of two
40 or more fused benzene rings and are found in multiple matrices in the environment, such as water, air, soils, food, etc.

^aCentre Grup de Tècniques de Separació en Química (GTS), Edifici CN, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. E-mail: Montserrat.lopez.mesas@uab.cat; Tel: +34 93 581 49 38

^bInstitut d'Investigació Tèxtil i Cooperació Industrial de Terrassa (INTEXTER), Edifici TR7, Carrer Colom, 15, 08222, Terrassa, Spain

^cUMR 6014 COBRA, Université de Rouen, 55 Rue Saint Germain, 27000 Évreux, France.

PAHs arrive to the soil by dry and wet deposition mechanisms, among others, where are known to degrade into metabolites through different paths, processes naturally controlled by many
55 microorganisms like *Pseudomonas*, *Burkholderia cepacia*, *Sphingomonas*, *Flavobacterium*^{2,3} and other groups like actinomycetes⁴, white-rot fungi⁵, etc.

On the other hand, heavy metals can also be found in the earth's crust, soils and vegetation, and many of them are essential
60 for the growth and development of living organisms but can become toxic if they exceed certain thresholds. There are studies that showed that heavy metals can have an effect on microbial communities, inducing changes on the size, growth and activity⁶ as well as reducing the availability of substrates used for their
65 respiration or causing acute toxicity leading to the death of microorganisms⁷. Therefore, the scientific community agreed that this group of pollutants could have a negative effect on the biodegradation of organic compounds (such as PAHs) through the inhibition of the enzymatic activity involved in these
70 processes. This led to the apparition of some studies oriented to assess the toxicity of certain mixtures of PAHs and heavy metals, observing synergistic or antagonist effects on toxicity and/or enzymatic activity depending on the kind and relative concentration of these pollutants^{8,9,10,11}.

75 About the biological degradation of PAHs in the presence of heavy metals, some authors reported an absence of biodegradation of Anth in the presence of Pb¹² or a decrease in the mineralization of Phe when communities were exposed to Cu¹³. Nonetheless, these authors observed the mentioned effects
80 in studies conducted under *in vitro* conditions, which is useful for the evaluation of specific effects, for example, on enzymatic activities, but it is also very important to consider the interaction

of the environmental matrix where these can take place. Therefore, other authors have also studied the effect of heavy metals such as Cd, Hg, Pb, Zn, Cu, Ni on the degradation of mixtures of several PAHs in environmental matrices, finding significant differences depending on the experimental conditions tested^{14,15,16}. However, most of these studies are performed throughout the evaluation of individual interactions between both classes of pollutants and the assessment of the possible effect of their mixtures, all together in an environmental matrix, has not been deeply studied yet.

Hence, in this study, a group of natural soil based microcosms are prepared, supplemented with PAHs and different concentrations of heavy metals in order to follow PAHs biodegradation along two months. The main objective is to assess and give a general view of the influence of different levels of pollution by heavy metals on the degradation of PAHs by soil microbial communities in a well-defined scenario and under controlled conditions. First, a soil from Catalonia is carefully selected and characterized to decide the concentration of PAHs to be introduced in microcosms and to determine the bioavailable content of heavy metals originally present. Secondly, a series of bacterial growth assays are performed in order to select the range of heavy metals concentration to be studied. Finally, microcosms are prepared and analyzed to conduct the biodegradation experiments and pursue the main objective cited above.

2 Experimental

2.1 Chemicals

Toluene, acetone (all of HPLC grade) and nitric acid (69.5 %) were obtained from Sigma Aldrich (Barcelona, Spain) and hydrochloric acid (37 %) from Panreac (Barcelona, Espanya). Water was purified and deionized using an Elga Classic system from Veolia Water Solutions and Technology (Madrid, Spain). The internal standard, perdeuterated phenanthrene (Phe-d₁₀) and five PAHs used to spike soils in microcosms: phenanthrene, fluoranthene, pyrene, benzo[a]pyrene, benzo[b]fluoranthene, were purchased from Sigma-Aldrich (Madrid, Spain). A stock solution of the five PAHs was prepared in acetone. Nitrate metal salts (cobalt, chromium, manganese, lead, zinc) and copper sulfate were acquired from Merck (Madrid, Spain). Stocks solutions were prepared in diluted nitric acid.

Ringer Oxoid BR52 was purchased from ThermoFisher Scientific (Barcelona, Spain) and Triptic Soy Agar from Scharlab (Barcelona, Spain), all used for bacterial culture assays.

2.2 Collection of soil samples

Soil samples were collected in March 2013 nearby the area of Ripoll's river (an area of sparsely populated scrubland with irregular cover) located in Sabadell (Catalunya, Spain). The moisture content was 1.9±0.2 %, organic matter content did not exceed 0.9±0.2 % and the maximum water holding capacity (MWHC) was 32±1 %. Carbonates content reached 6±1 % and electrical conductivity was 194±7 μS·cm⁻¹. The bioavailable fraction (as a result of the analysis of the exchangeable fraction extracted with MgCl₂ 0.1 M) contained 1.46±0.09 mg·kg⁻¹ of heavy metals. The total amount of the five PAHs selected was 264±12 μg·kg⁻¹ and the number of colony forming units (CFU) was 1.5·10⁴ ± 4.0³ CFU·g⁻¹. Field-moist soil was sieved to 2 mm particle size and stored at 20 °C during one week (under humidity control). Ten per cent of the collected soil was sterilized by autoclaving, dried one night at 35 °C, softly crushed (for MAE,

65 fine and homogeneous particles are necessary to obtain good and reproducible results) and used to introduce PAHs during microcosms' preparation.

2.3 Preparation of microcosms

For the preparation of microcosms, forty-four sterile glass flasks were filled with 10 g of dry sterile soil each and spiked to reach a total concentration of 1000 mg·kg⁻¹ of the five selected PAHs. After homogenization, they were set under an extractor hood during 48 h to better distribute PAHs and evaporate acetone. After a week of stabilization, dry sterilized soils enriched with PAHs were mixed with 91.7 g wet native soil (equivalent to 90 g dry soil according to moisture content) and homogenized to obtain microcosms. Therefore, final PAHs concentration in microcosms was diluted to 100 mg·kg⁻¹. Later, heavy metals were introduced dissolved in 22.1 mL of sterile deionized water (19.0 % vol/wt of water; that is 60 % of MWHC) and homogenized again. Incubations were performed in 200 mL sterilized glass flask, hermetically closed and periodically aerated, and incubated at 20 °C in static mode in a dark room. Forty-four microcosms were prepared, divided in four different groups depending on the metal content to be added. Each group consisted of 8 microcosms for every day of analysis (0, 3, 7, 10, 15, 21, 30 and 60 days). The first group was not spiked with heavy metals (native concentration found in soil), and the other three were prepared by spiking heavy metals to reach a final concentration of 10, 250 and 500 times the bioavailable concentration of heavy metals found in the soil.

A blank was also evaluated, consisting of 100 g of dry sterile soil spiked with PAHs to reach a final concentration of 100 mg·kg⁻¹ and 22.1 mL of sterile deionized water with the intermediate level of heavy metals (x250). Finally, other microcosms were prepared in duplicate for quality control purposes to assess reproducibility on the preparation procedure.

2.4 Microwave assisted extraction of PAHs from soil

MAE was performed using a MARS X equipment (CEM Corporation, Matthews, USA). Wet soils from microcosms were previously dried one night at 35 °C and then crushed. Before the extraction, perdeuterated phenanthrene (Phe-d₁₀) was added as internal standard to reach a concentration of 1.0 mg·L⁻¹. A sample size of 1.5 g of crushed dry soil was extracted using 25 mL of acetone:toluene (1:1) during 30 minutes at 140 °C and 1200 W. Then, extracts were filtered through 0.22 μm PVDF filters (Tianjin Heiaon Technology, Tianjin, China) in order to remove soil particles prior to the analysis.

2.5 GC/MS analysis of PAHs

After MAE, 1 μL of the filtered sample extract was injected (pulsed splitless injection at 275 °C) by an autosampler (Triplus) in a gas chromatographer (Trace GC Ultra) coupled to a mass spectrometer (DSQ II) from ThermoFisher Scientific (Barcelona, Spain). The column was a TRMS-5 poly(phenylsilphenylen) siloxane (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm). The oven program started at 60 °C (5 min isothermal) increasing to 290 °C at 8 °C·min⁻¹ (2 min isothermal), under a constant carrier gas flow of 1.5 mL·min⁻¹. Ionization source temperature was set at 225 °C (electron impact, 70 eV) and the transfer line at 300 °C. The detection of the analytes was conducted in selected ion monitoring (SIM), with the selected masses shown in Table 1. The software used was Xcalibur v.2.6.2.

Table 1. Masses of ion selected monitoring (SIM) for the analysis of PAHs by GC/MS.

| PAH | Masses of PAH | Retention time (min) |
|---------------------|---------------|----------------------|
| Phe-D ₁₀ | 188 | 18.72 |
| Phe | 178, 179, 176 | 18.80 |
| Fluo | 202, 101, 203 | 22.35 |
| Pyr | 202, 200, 203 | 23.00 |
| BbF | 252, 253, 125 | 29.65 |
| BaP | 252, 253, 125 | 30.50 |

2.6 ICP/MS analysis of heavy metals

The instrument used was an ICP/MS (Thermo Elemental X Series 2), with an autosampler (CETAC ASX520), from ThermoFisher Scientific (Barcelona, Spain).

Monoelemental and multielemental metal solutions were used to prepare the standards in 2 % nitric acid for the instrument calibration. Total dissolved solids (TDS) were fixed under 0.5 % to minimize depositions on skimmer and sampling cones. Sc, Ga, In and Tl were used as internal standards at 5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. Determinations were done in triplicate and, between samples, lines were rinsed during 1 min at 2.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ with 2 % nitric acid. The metals analyzed were Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn and Pb. An auxiliary gas flow He/H₂ (at 4.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$) was used in the collision cell to reduce interferences, principally as a result of species recombination (e.g. ⁴⁰Ar¹²C⁺ interferes with ⁵²Cr). The software used on data treatment was PlasmaLab v.2.6.2.

In order to determine the bioavailable fraction, two different extractants were considered for single extractions methods: H₂O and MgCl₂. The use of H₂O represents the water-soluble fraction, including free ions or those forming complexes with soluble organic matter, while the use of MgCl₂ represents the exchangeable fraction, including metals adsorbed in the solid surfaces by weak electrostatic interactions and metals that can be released by ion exchange processes. For the water-soluble fraction, a mixture of soil:water (1:5) was agitated for 2 h, at room temperature, centrifuged for 15 min at 2500 rpm and filtered through 0.22 μm PVDF filters. For the exchangeable fraction, a mixture of soil:MgCl₂ 0.1 M (1:8) was agitated for 1 h, at room temperature, centrifuged for 15 min at 2500 rpm and filtered through 0.22 μm PVDF filters. The supernatant was later analyzed following the methodology described above.

2.7 Selection of spiking concentrations of PAHs and heavy metals

Five representative PAHs were selected to conduct the biodegradation studies: Phe (three rings), Fluo and Pyr (four rings) and BbF and BaP (five rings). The concentration of PAHs spiked in microcosms was selected according to the PAH content found in soil and other related biodegradation studies^{17,18}. In these biodegradation studies soil was typically spiked with PAHs at a concentration of 100-10000 times that found in soil.

First of all, a survey analysis of the bioavailable fraction of heavy metals in soil was conducted by ICP/MS. It was possible to determine Cr, Mn, Co, Ni, Cu, Zn and Pb over the QL. Therefore, these seven metals were selected for the present study. To select the spiking concentrations of heavy metals, microbiological assays were carried out to assess possible effects on bacterial growth. First, fresh native soil collected was separated in nine different portions of 100 g. Eight of them were spiked to reach a final concentration of 2, 5, 10, 50, 100, 250, 500 and 1000 times the bioavailable heavy metals concentration found in soil. The

ratio of the bioavailable heavy metals concentration found in the native soil was preserved (Zn~Mn>Cu>Cr~Pb>Ni>Co). Metals were introduced in 22.1 mL of deionized sterile water. The ninth portion was not spiked (native bioavailable concentration found in soil), but 22.1 mL of sterilized water were also added. After this, they were kept under temperature and humidity control during five days to stabilize the preparations.

A total of sixty-three incubations experiments (including duplicates) in Petri dishes were performed. To do so, bacteria from 1.0 g of soil (containing the concentrations of heavy metals cited above) were extracted with 100 mL of sterile deionized water for 30 min, under constant stirring. Then, series of dilutions of the main extract were prepared in Ringer solution and 0.1 mL was poured onto nutrient agar and incubated at 30 °C for 48 h. The nutrient agar was prepared dissolving 40.0 g of triptic soy agar (TSA) in 1 L of water. All the material used was sterilized by autoclaving at 120 °C during 20 min, previous to any operation.

2.6 Quality Assurance and Quality control (QA/QC)

For GC/MS and ICP/MS analysis, control samples were used to evaluate analysis performance. Standard solutions were analyzed between soil samples to verify that calibration curves were valid throughout the analysis and that the instrument was not affected by the matrix of the samples (Continuing Calibration Verification, CVV). For GC/MS analysis an internal standard was used (perdeuterated phenantrene) and for ICP/MS the internal standards used were Sc, Ga, In and Tl. In both cases, recoveries of the compounds from the standard solutions were accepted within 80-120 % of the nominal concentrations. Furthermore, one blank, was also included for each day of microcosms' analysis to control recovery of initial PAHs concentration along the time, as mentioned above.

3 Results and discussion

3.1 Determination of bioavailable fraction of heavy metals in the soil

The results of the analysis of the water-soluble and exchangeable fractions are shown in Table 2. It can be seen that water is a much weaker extractant than MgCl₂ and that Zn and Mn are the most concentrated metals in the exchangeable fraction, whereas Ni and Co the less concentrated, with a difference of one order of magnitude. In fact, it is accepted that the use of MgCl₂ in single extractions constitutes a quick method to estimate the bioavailable metal content in soil. Therefore, in this study, the analysis of the exchangeable fraction will be used with this purpose¹⁹.

Table 2. Concentration of soluble, exchangeable and bioavailable fractions of heavy metals in the studied soil ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

| Heavy Metal | Soluble fraction | Exchangeable Fraction (bioavailable) |
|----------------|------------------|--------------------------------------|
| Cr | 0.006 ± 0.003 | 0.15 ± 0.01 |
| Mn | 0.049 ± 0.005 | 0.45 ± 0.05 |
| Co | 0.0008 ± 0.0006 | 0.011 ± 0.001 |
| Ni | 0.012 ± 0.003 | 0.049 ± 0.009 |
| Cu | 0.088 ± 0.005 | 0.17 ± 0.03 |
| Zn | 0.023 ± 0.005 | 0.48 ± 0.07 |
| Pb | 0.0018 ± 0.0003 | 0.153 ± 0.003 |
| Σ heavy metals | 0.18 ± 0.08 | 1.46 ± 0.09 |

Table 3. Concentration of metals in the different spiked soils ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) prepared for microbiological growth assessment, and number of $\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ after exposition of bacterial communities to the shown concentrations. Experiments in bold indicate the representative levels selected to evaluate the influence of heavy metals on PAHs degradation (section 3.1)

| Name of incubation experiment | Cr | Mn | Co | Ni | Cu | Zn | Pb | ΣHM | $\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ ($\pm\text{CI}_{95}\%$, $n=1$, $f.d.$, $n=2$) |
|-------------------------------------|-------------|-------------|---------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------------|--|
| Non-spiked (native bioavailable) | - | - | - | - | - | - | - | - | $(1.5 \pm 0.4)\cdot 10^4$ |
| x2 | 0.150 | 0.500 | 0.0100 | 0.0500 | 0.250 | 0.500 | 0.150 | 1.61 | $(1.3 \pm 0.2)\cdot 10^4$ |
| x5 | 0.600 | 2.00 | 0.0400 | 0.200 | 1.00 | 2.00 | 0.600 | 6.44 | $(1.5 \pm 0.2)\cdot 10^4$ |
| x10 | 1.35 | 4.50 | 0.0900 | 0.450 | 2.25 | 4.50 | 1.35 | 14.5 | $(1.1 \pm 0.3)\cdot 10^4$ |
| x50 | 7.35 | 24.5 | 0.490 | 2.45 | 12.3 | 24.5 | 7.35 | 78.9 | $(1.3 \pm 0.1)\cdot 10^4$ |
| x100 | 14.9 | 49.5 | 0.990 | 4.95 | 24.8 | 49.5 | 14.9 | 160 | $(1.4 \pm 0.1)\cdot 10^4$ |
| x250 | 37.4 | 125 | 2.49 | 12.5 | 62.3 | 125 | 37.4 | 402 | $(1.4 \pm 0.3)\cdot 10^4$ |
| x500 | 74.9 | 250 | 4.99 | 25.0 | 125 | 250 | 74.9 | 805 | $(2.2 \pm 0.2)\cdot 10^4$ |
| x1000 | 150 | 500 | 9.99 | 50.0 | 250 | 500 | 150 | 1610 | $(1.9 \pm 0.2)\cdot 10^4$ |

3.1 Microbiological growth assessment at different concentrations of heavy metals

As a result of the bioavailable concentrations found in soil, 10 microbiological assays were prepared following previous indications (section 2.7) with the concentrations of the Table 3. In this table it can also be seen that the number of $\text{CFU}\cdot\text{g}^{-1}$ determined in each soil does not vary significantly after exposing bacterial communities to eight different total concentrations of 15 heavy metals. This indicates that the growth of tolerant species was not affected by the contamination introduced. Therefore, x10, x250 and x500 were selected as the three representative levels to conduct the experiments of biodegradation of PAHs in the presence of different concentrations of heavy metals. Lower 20 levels were discarded because, in previous experiments, no significant influence on PAHs biodegradation was observed. The higher level was also discarded because it contained an amount of some metals above the maximum concentration permitted by the current Spanish legislation²⁰.

25 Therefore, in order to study the influence of the different concentrations of heavy metals on PAHs biodegradation, the four groups of microcosms prepared included: the native soil bioavailable concentration of heavy metals (non-spiked with heavy metals), x10 (ten times the bioavailable concentration), 30 x250 and x500.

3.1 PAHs biodegradation at different concentrations of heavy metals

35 The results of PAHs biodegradation at different concentrations of heavy metals are shown in Figure 1. First of all, it can be observed that SD values are very low (RSD below 5 %), which means that the homogenization of the microcosms was optimally performed (which means that all PAHs are equally distributed in the soil matrix). Secondly, the analysis of the blank (sterile soil 40 doped with PAHs and x250 level of heavy metals) demonstrates that the initial concentration of PAHs found in microcosms after spiking remained constant throughout the sixty days of the experiments, proving that the degradation observed in the other 45 microcosms (not sterilized) is due to biological activity of the native soil and not for other kind of chemical reactions or photooxidation. On the other hand, the analysis of duplicates of four microcosms (at the intermediate level of heavy metals) did not show important differences (below 8 % of RSD), which 50 indicates that the preparation of microcosms is also reproducible.

Figure 1 shows different degradation tendencies, which can be divided in two groups. On one hand, Phe, Fluo and Pyr (3, 4 and 55 4 ring-PAHs, respectively) and, on the other hand, BbF and BaP (5 ring-PAH). Phe is a low molecular weight PAH (LWPAHs) while the rest are high molecular weight PAHs (HWPAs). It can be seen that the variations on the degradation at the different levels of heavy metals are more important for the cases of Phe, 60 Fluo and Pyr than for BbF and BaP. For the first three, generally speaking, the higher the concentration of heavy

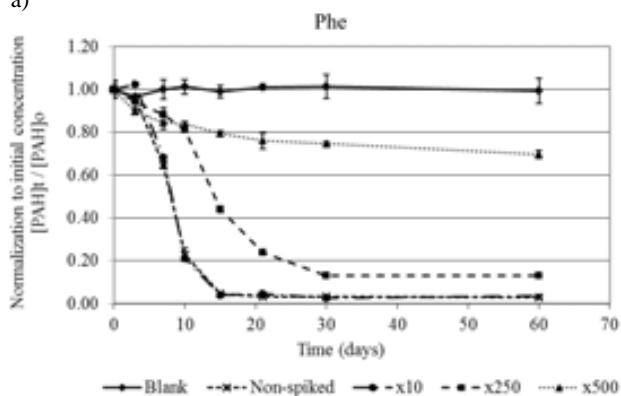
metals, the less the degradation of PAHs (Figure 1a, 1b and 1c). There are not significant differences between the degradation in 65 the non-spiked soil and the lower level of heavy metals (x10) microcosms, possibly because the concentration introduced does not represent a high toxicity for the living microorganisms in the soil. After 10 days, 77 and 79% of Phe was degraded in the non-spiked and x10 microcosms, respectively, while Pyr (22 and 25 70 %) and Fluo (16 and 24 %) seem to do it more slowly. For these last two PAHs, higher degradation percentages were found after 15 days, between 84-90 %, for both compounds in both microcosms (Phe was degraded up to a 95-96 %, already). These results agree with the known ability of many microorganisms to 75 degrade Phe faster than other PAHs due to the existence of a "K" and "bay" regions in its structure that confer an optimum conformation for the anchorage of multiple enzymes involved in the oxidation of this kind of compounds²¹.

Contrary to the observed degradation at low levels of heavy 80 metals, stronger differences can be seen at the higher levels (x250 and x500). In x250 microcosm, the degradation of Phe was much more slow than the observed before, arriving to 80 % after 21 days of incubation, whereas at lower levels this value was achieved after 10 days (now at x250, after 10 days, only 19 % of 85 Phe has been degraded). Nevertheless, after 60 days, 87 % of Phe was metabolized, which is significantly a higher degradation percentage than the observed for Fluo (60 %) and Pyr (53 %) at this time. Finally, no degradation of Fluo and Pyr was detected after two months in x500 microcosms, and only 30 % of Phe was 90 eliminated. Therefore, there was an important decrease on the degradation of Phe, Fluo and Pyr as the concentration of heavy metals increased, showing a significant effect when mixed pollutants are present in soil (PAHs and heavy metals), affecting the activity of microorganisms.

95 On the other hand, the degradation of BbF and BaP (HWPAs) seems not to be affected by the different concentrations of heavy metals (Figure 1d and 1e), probably due to the little ability of the bacterial consortiums to efficiently

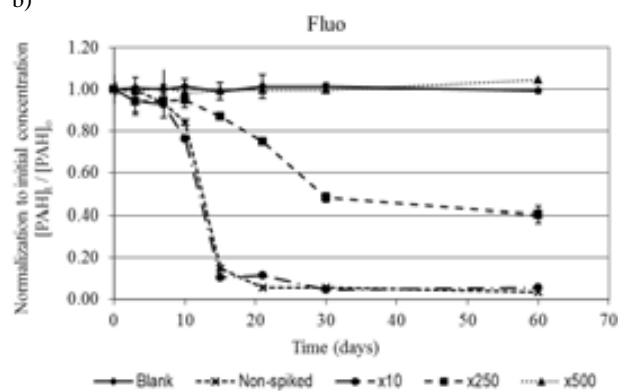
degrade these compounds under any circumstances. After 60

a)

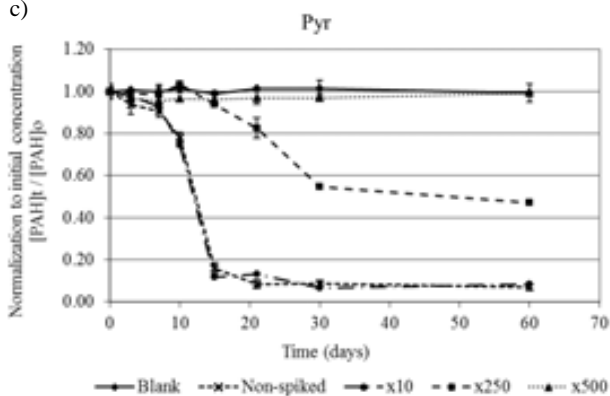


days, only 29, 22, 16 and 19 %

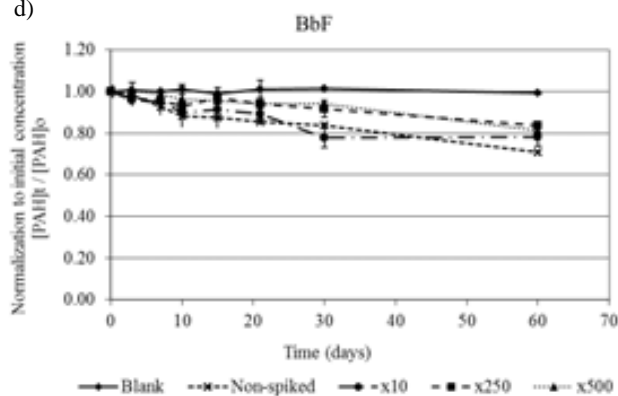
b)



c)



d)



e)

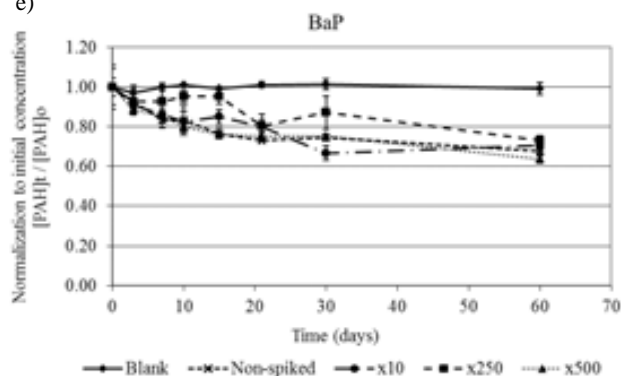


Fig. 1 Degradation of PAHs along the time at different concentrations of heavy metals; a) Phe, b)Fluo, c)Pyr, d)BbF, e) BaP. Error bars indicate the standard deviation of replicates (n=2).

of BbF was degraded in the non-spiked, x10, x250 and x500 microcosms, respectively, while the results were not much different for BaP either (32, 30, 27 and 36 %) after sixty days. In fact, it is widely accepted that the higher the molecular weight of PAHs the lower degradation ability of microorganisms, because LWPAHs are more suitable to be used as a sole carbon energy source²². HWPAAHs can also represent a carbon source for microorganisms but only a few can efficiently degrade them. This is principally explained by the progressive decrease in solubility and increase in hydrophobicity (therefore, bioavailability) as molecular weight increases. Another reason of the poor degradation of HWPAAHs is the lack of enzymatic induction, which is more complicated due to their bigger size and more complex conformation. This makes PAHs less accessible for the

active centers of the enzymes involved in the metabolism of many microorganisms. Nevertheless, in this study, Fluo and Pyr, which are HWPAAHs, were certainly degraded (although more slowly than Phe), and could be explained by the co-metabolism phenomena. Co-metabolism can be defined as a non-specific enzymatic reaction between a new substrate that competes with a primary substrate of similar structure for the active site of the enzyme²¹. This phenomena explains that degradation of certain HWPAAHs can be enhanced by the presence of simpler carbon source structures such as LWPAHs (e.g. Phe), which would not occur (or would be lower) in their absence. It was reported that the presence of Phe enhanced the biodegradation of Anth, Flu and Pyr²³ and also contributed to the increase in biomass when acting as a co-substrate for the co-metabolism of Chry, Fluo and Pyr^{24,25},

as could be happening in this study. It can be seen that the biodegradation of Fluo and Pyr always started later than Phe's (at any of the concentrations of heavy metals where degradation is observed) and, on the other hand, the degradation rates of Fluo PAHs may allow to degrade HWPAs at the expense of worse degradation of LWPAHs through a mechanism of competitive inhibition^{26,27}. In our experiment, this behavior can also be observed. Degradation of Phe evolved very fast until 10 days and, from this moment on, it seems to develop more slowly (10- 15 days), concurring with the beginning of a faster degradation of Fluo and Pyr.

About the degradation profile (for those cases where degradation is significantly observed; *i.e.* non-spiked, x10 and x250 microcosms), three different phases can be distinguished. The first one, generally comprising the first 7 days of the study, shows latent or very low microbiological activity and probably corresponds to an adaptation phase of the microorganisms in response to the stress caused by the introduced contamination (heavy metals and PAHs), which is in agreement with previous observations by other authors²⁸. However, bacterial communities exhibit different tolerance and those which are resistant evolve to a second phase, where degradation takes place very quickly (7-30 days). Finally, the third phase consists in the achievement of a plateau state, where biodegradation rate stabilizes or decreases again. This general profiles of degradation were also observed by some authors who saw a dependency between the adaptation time required by bacterial communities and the concentration of PAHs supplemented, establishing a direct relationship between the number of CFU·g⁻¹ and the percentage of degradation of these compounds^{26,27}. Among the few studies concerning the biodegradation of PAHs in the presence of heavy metals, some authors reported higher degradation rates for Pyr/Pb mixtures (30 and 300 mg·kg⁻¹, respectively) than for isolated Pyr (30 mg·kg⁻¹), suggesting that Pb promotes bacterial growth through the detoxification of Pyr, resulting in a higher degradation of this PAH²⁹. Other authors also had seen that Zn could enhance the mineralization of Phe³⁰, while other reported studies indicated that Zn (50-1000 mg·kg⁻¹) and Cu (50-100 mg·kg⁻¹) did not produce any significant effects on its degradation, but higher amounts of Cu caused a decrease in the biodegradation capability via reduction of dehydrogenase activity³¹. In the present work, there is no evidence that the mixtures of heavy metals enhance PAHs biodegradation but the opposite. Nonetheless, all the research cited above evaluated metal-PAH interactions individually and did not follow their behavior as a mixture. To study all contaminants together can be certainly difficult since soils can contain a high number of compounds at many different concentrations, leading to complex interactions between them. Nevertheless, the present work aims to give a general view about the degradation of a group of selected PAHs in the presence of different concentrations of some heavy metals in an environmental matrix under controlled conditions. Thus, individual interactions are not taken into account here and the discussion has been focused on the global effect of the mixed contaminants, as indicated.

4 Conclusions

A study about mixed pollutants has been successfully performed to assess the influence of different concentrations of seven heavy metals on the biodegradation of five PAHs along sixty days throughout the analysis of natural soil based microcosms.

The study of the interaction of mixed contaminants in a complex environmental matrix has shown that the different levels of heavy metals caused a significant effect on the biodegradation

and Pyr seem to decrease when Phe was nearly completely metabolized (easy to observe in x250 microcosms after 30 days or in non-spiked or x10 microcosms after 15 days). In the same line, there are authors that agree that the addition of mixtures of capability of Phe, Fluo and Pyr whereas no effect was detected on BbF and BaP.

These results show the importance of the decontamination of some heavy metal polluted areas if bioremediation activities applied for PAHs are to be performed, particularly those carried out by microbiological processes.

Acknowledgements

Authors acknowledge the financial support provided by Spanish Ministry MICINN (CTQ2009-07432) and MINECO (CTM2012-30970). O. Baltrons acknowledges the research support by Universitat Autònoma de Barcelona (P.I.F. Grant 403-03-1/09).

References

- 1 ATSDR Agency for Toxic Substances & Disease Registry. Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): What are Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)? <http://www.atsdr.cdc.gov/>
- 2 M. A. Siddiqi, Z. X. Yuan, S. A. Honey, S. Kumar, H. C. Sikka, *Polycycl. Aromat. Comp.*, 2002, **22**, 621.
- 3 K. Watanabe, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2001, **12**, 237.
- 4 K. S. Samanta, O. V. Singh and R. K. Jain, *Trends Biotechnol.*, 2002, **20**, 243.
- 5 D. Boyle, C. Wiesner, A. Richardson, *Soil. Biol. Biochem.*, 1998, **30**, 873.
- 6 K. E. Giller, E. Witter, S. P. McGrath, *Soil. Biol. Biochem.*, 1998, **30**, 1389.
- 7 L. Landi, G. Renella, J. L. Moreno, L. Falchini, P. Nannipieri, *Biol. Fertil. Soils*, 2000, **32**, 8.
- 8 C. J. Moreau, P. L. Klerks, C. N. Haas, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1999, **37**, 251.
- 9 G. Shen, Y. Lu, Q. Zhou, J. Hong, *Chemosphere*, 2005, **61**, 1175.
- 10 G. Shen, Y. Lu, Q. Zhou, J. Hong, *Ecotox. Environ. Safe*, 2006, **63**, 474.
- 11 P. Thavamani, S. Malik, M. Beer, M. Megharaj, R. Naidu, *J. Environ. Manage.*, 2012, **99**, 10.
- 12 S. Fualkowska, K. Lisowska, J. Dlugonski, *J. Basic. Microbiol.*, 1998, **38**, 361.
- 13 J. Sokhn, F. A. A. M. De Leij, T. D. Hart, J. M. Lynch, *Lett. Appl. Microbiol.*, 2001, **33**, 164.
- 14 P. Baldrian, C. Wiesche, J. Gabriel, F. Nerud, F. Zadrazil, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, **66**, 2471.
- 15 S. Khan, A. E. L. Hesham, G. Qing, L. Shuang, J. He, *J. Soil. Sediment.*, 2009, **9**, 482.
- 16 L. Ke, L. Luo, P. Wang, T. Luan, N. F. Y. Tam, *Bioresour. Technol.*, 2010, **101**, 6950.
- 17 M. Niepceron, F. Martin-Laurent, M. Crampon, F. Portet-Koltalo, M. Akpa-Vinceslas, M. Legras, D. Bru, F. Bureau, J. Bodilis, *Environ. Pollut.*, 2013, **180**, 199.
- 18 O. Baltrons, M. Lopez-Mesas, C. Palet, F. Le Derf, F. Portet-Koltalo, *Anal. Methods*, 2013, DOI 10.1039/C3AY41227J
- 19 D. Bakircioglu, Y. B. Kurtulus, H. Ibar, *Clean-Soil, Air, Water*, 2011, **39**, 728.
- 20 Spanish Government, *Real Decreto 1310/1990*, <http://www.boe.es/boe/dias/1990/11/01/pdfs/A32339-32340.pdf>, Març 2013.

-
- 21 X. X. Zhang, S. P. Cheng, J. C. Zhu, S. L. Sun, *Pedosphere*, 2006, **16**, 555.
 - 22 J. L. Stroud, G. I. Paton, K. T. Semple, *FEMS Microbiol. Lett.*, 2007, **272**, 120.
 - 23 S. Y. Yuan, J. S. Chang, J. H. Yen, B. V. Chang, *Chemosphere*, 2001, **43**, 273
 - 24 S. Hwang, T. J. Cutright, *Environ. Sci. Pollut.*, 2003, **10**, 277.
 - 25 M. N. Igwo-Ezipke, O. G. Gbenle, M. O. Ilori, J. Okpuzor, A. A. Osuntoki, *Res. J. Environ. Sci.*, 2010, **4**, 317.
 - 26 N. R. Couling, M. G. Towell, K. T. Semple, *Environ. Pollut.*, 2010, **158**, 3411.
 - 27 C. Wang, F. Wang, T. Wang, Y. Bian, X. Yang, X. Jiang, *J. Hazard. Mater.*, 2010, **176**, 41.
 - 28 J. Wen, D. Gao, B. Zhang, H. Liang, *Int. Biodeter. Biodegr.*, 2011, **65**, 600.
 - 29 S. Khan, A. E. L. Hesham, G. Qing, L. Shuang, J. He, *J. Soil. Sediment.*, 2009, **9**, 482.
 - 30 C. J. Moreau, P. L. Clerks, C. N. Haas, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1999, **37**, 251.
 - 31 I. S. Obuekwe, K. T. Semple, *Environ. Monit. Assess.*, 2013, DOI 10.1007/s 10661-013-3311-3.

ANNEX III

EXEMPLE D'UNA ANOVA DE LA REGRESSIÓ LINEAL PER LA RECTA DE CALIBRATGE DEL NAPH

EXEMPLE D'UNA ANOVA DE LA REGRESSIÓ LINEAL PER LA RECTA DE CALIBRATGE DEL NAPH'

| concentració (mg·L-1) | Y Haph | | Y mitjana | | Y mitj-Yi | (y mitj-yi)^2 | ERROR PUR | |
|-----------------------|--------|-------|------------------------|-----------------|---------------------|---------------------------|--|-------|
| 0.005 | 0.164 | 0.005 | 0.159 | 0.005 | -4.757E-03 | 2.263E-05 | sumatori quadrats | |
| 0.005 | 0.165 | 0.010 | 0.259 | 0.005 | -6.088E-03 | 3.707E-05 | 3.2647 | |
| 0.005 | 0.159 | 0.025 | 0.680 | 0.005 | 0.000E+00 | 0.000E+00 | | |
| 0.010 | 0.257 | 0.050 | 1.318 | 0.010 | 2.031E-03 | 4.125E-06 | | |
| 0.010 | 0.265 | 0.100 | 2.572 | 0.010 | -5.610E-03 | 3.147E-05 | | |
| 0.010 | 0.256 | 0.411 | 12.889 | 0.010 | 3.579E-03 | 1.281E-05 | | |
| 0.025 | 0.694 | 0.640 | 17.842 | 0.025 | -1.414E-02 | 2.001E-04 | | |
| 0.025 | 0.653 | 1.000 | 29.406 | 0.025 | 2.737E-02 | 7.493E-04 | | |
| 0.025 | 0.693 | | | 0.025 | -1.323E-02 | 1.750E-04 | | |
| 0.050 | 1.281 | | | 0.050 | 3.684E-02 | 1.357E-03 | | |
| 0.050 | 1.322 | | | 0.050 | -4.121E-03 | 1.699E-05 | | |
| 0.050 | 1.351 | | | 0.050 | -3.272E-02 | 1.070E-03 | | |
| 0.100 | 2.539 | | | 0.100 | 3.322E-02 | 1.104E-03 | | |
| 0.100 | 2.596 | | | 0.100 | -2.404E-02 | 5.779E-04 | | |
| 0.100 | 2.581 | | | 0.100 | -9.186E-03 | 8.438E-05 | | |
| 0.411 | 13.201 | | | 0.411 | -3.126E-01 | 9.774E-02 | | |
| 0.411 | 12.629 | | | 0.411 | 2.596E-01 | 6.741E-02 | | |
| 0.411 | 12.836 | | | 0.411 | 5.301E-02 | 2.810E-03 | | |
| 0.640 | 17.788 | | | 0.640 | 5.429E-02 | 2.947E-03 | | |
| 0.640 | 17.897 | | | 0.640 | -5.429E-02 | 2.947E-03 | | |
| 1.000 | 29.107 | | | 1.000 | 1.299E+00 | 1.687E+00 | | |
| 1.000 | 29.529 | | | 1.000 | -1.227E-01 | 1.504E-02 | | |
| 1.000 | 30.582 | | | 1.000 | -1.176E+00 | 1.383E+00 | | |
| | | | Y predita segons recta | y predita-ymitj | (y predita-ymitj)^2 | FALTA D'AJUST (LOF) | Fexp=(OM Falta d'Ajust/OM Error Pur) | |
| 29.38897946 | m | 0.005 | 9.360E-02 | -6.567E-02 | 4.313E-03 | sumatori quadrats pondera | | |
| -0.053342202 | b | 0.010 | 2.405E-01 | -1.859E-02 | 3.454E-04 | 4.2552 | Fexp= | 3.259 |
| | | 0.025 | 6.814E-01 | 1.408E-03 | 1.983E-06 | | F crít, 1 via, 99%, 6.15= | 4.318 |
| | | 0.050 | 1.416E+00 | 9.812E-02 | 9.627E-03 | OM Falta d'Ajust | | |
| | | 0.100 | 2.886E+00 | 3.133E-01 | 9.814E-02 | LOF/gdll (gdll=K-2)=8-2=6 | Ho --> no hi ha falta d'ajust --> el model és lineal | |
| | | 0.411 | 1.203E+01 | -8.631E-01 | 7.450E-01 | 0.7092 | H1 --> hi ha falta d'ajust --> el model no és lineal | |
| | | 0.640 | 1.876E+01 | 9.133E-01 | 8.340E-01 | | | |
| | | 1.000 | 2.934E+01 | -7.065E-02 | 4.992E-03 | | Fexp<Fcrit --> Ho --> El model és lineal | |

ANNEX IV

COMPROVACIO ESTADISTICA DE LA DIFERENCIA ENTRE MITJANES DE L'ESTUDI DE L'EFECTE DEL
PRETRACTAMENT DE MOSTRA: TAMISAT I MÒLTA.

COMPROVACIÓ ESTADÍSTICA DE LA DIFERÈNCIA ENTRE MITJANES DE L'ESTUDI DE L'EFECTE DEL PRETRACTAMENT DE MOSTRA: TAMISAT I MÒLTA.

Test F, comprovació de la diferència estadística de variàncies (**Error! No s'ha trobat l'origen de la referència.**):

- Prova bilateral, al 95 % de confiança, amb el mateix nombre de graus de llibertat (f.d.) per les dues mostres (n-1), on $n_i, n_j = 2$.
- $F_{\text{crític}} = 647,8$

$$H_0 \rightarrow s_i^2 = s_j^2$$

$$H_1 \rightarrow s_i^2 \neq s_j^2$$

$$F_{\text{exp}} = \frac{s_i^2}{s_j^2}, \text{ amb } s_i^2 > s_j^2$$

$$F_{\text{exp}} \leq F_{\text{crític}} \rightarrow \text{acceptem } H_0$$

$$F_{\text{exp}} > F_{\text{crític}} \rightarrow \text{acceptem } H_1$$

Test F, comprovació de la diferència estadística de variàncies del pretractament de la mostra

| | F_{exp} entre A i B | F_{exp} entre B i C | $F_{\text{crític}} 95\%, 2 \text{ cues}, 1,1 \text{ f.d.}$ |
|--------------------|---------------------------------|---------------------------------|--|
| Polinyà | 1,445 | 1,944 | |
| Sant Quirze | 1,219 | 5,369 | 647,8 |
| Terrassa | 1,361 | 1,000 | |

A: tamisat, B: tamisat i molturat, C: molturat

Un cop comprovades la igualtat de variàncies es pot dur a terme el test T, de diferències significatives entre mitjanes (**Error! No s'ha trobat l'origen de la referència.**):

- Prova bilateral, al 95 % de confiança, amb n_i+n_j-2 graus de llibertat (f.d.), on $n_i, n_j = 2$.
- $t_{\text{crític}} = 4,303$

$$H_0 \rightarrow \bar{X}_i = \bar{X}_j$$

$$H_1 \rightarrow \bar{X}_i \neq \bar{X}_j$$

$$t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{X}_i - \bar{X}_j|}{s_p \sqrt{\frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j}}}, \text{ on } s_p = \sqrt{\frac{(n_i - 1)s_i^2 + (n_j - 1)s_j^2}{n_i + n_j - 2}}$$

$$t_{\text{exp}} \leq t_{\text{crític}} \rightarrow \text{acceptem } H_0$$

$$t_{\text{exp}} > t_{\text{crític}} \rightarrow \text{acceptem } H_1$$

Test T de diferències significatives entre mitjanes del pretractament de la mostra

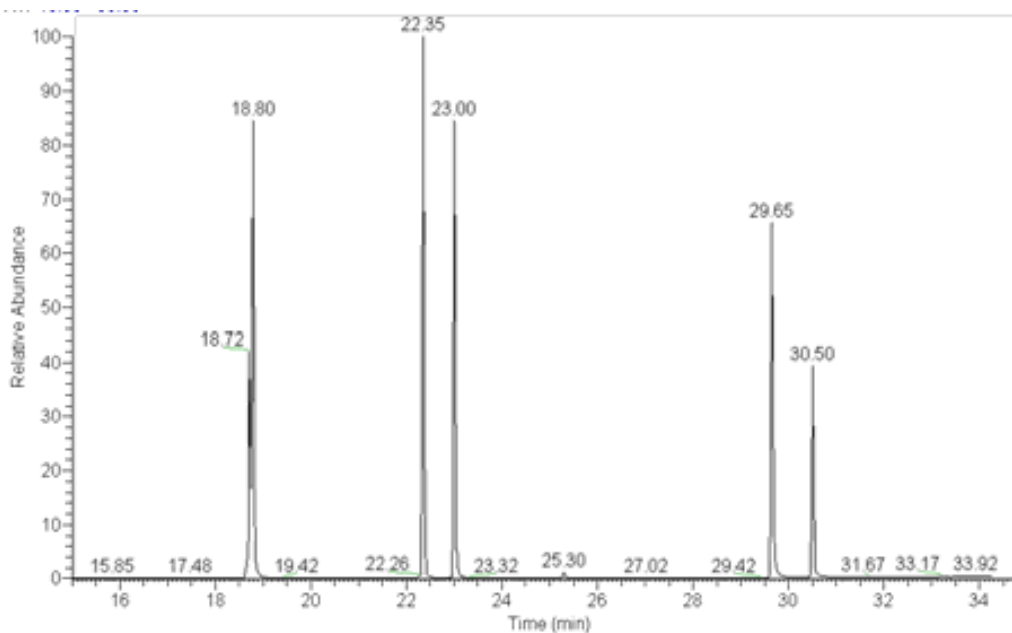
| | t_{exp} entre A i B | t_{exp} entre B i C | t_{crit} 95 %, 2 cues, 2 f.d, |
|--------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Polinyà | 6,395 | 1,161 | |
| Sant Quirze | 18,47 | 30,78 | 4,303 |
| Terrassa | 7,530 | 5,736 | |

A: tamisat, B: tamisat i molturat, C: molturat

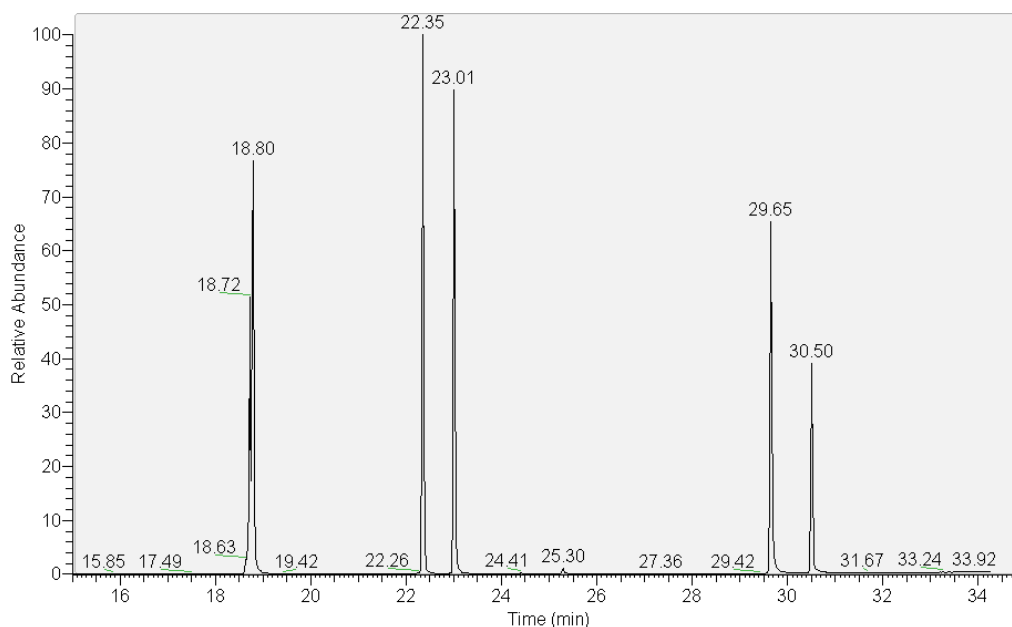
ANNEX V

EXEMPLE D'ALGUNS CROMATOGRAMES OBTINGUTS DE L'ANÀLISI PER GC/MS D'ALGUNS MICROCOSMOS
PREPARATS PER L'ESTUDI DE LA INFLUÈNCIA DE DIFERENTS CONCENTRACIONS DE METALLS PESANTS
EN LA DEGRADACIÓ DE PAHs,

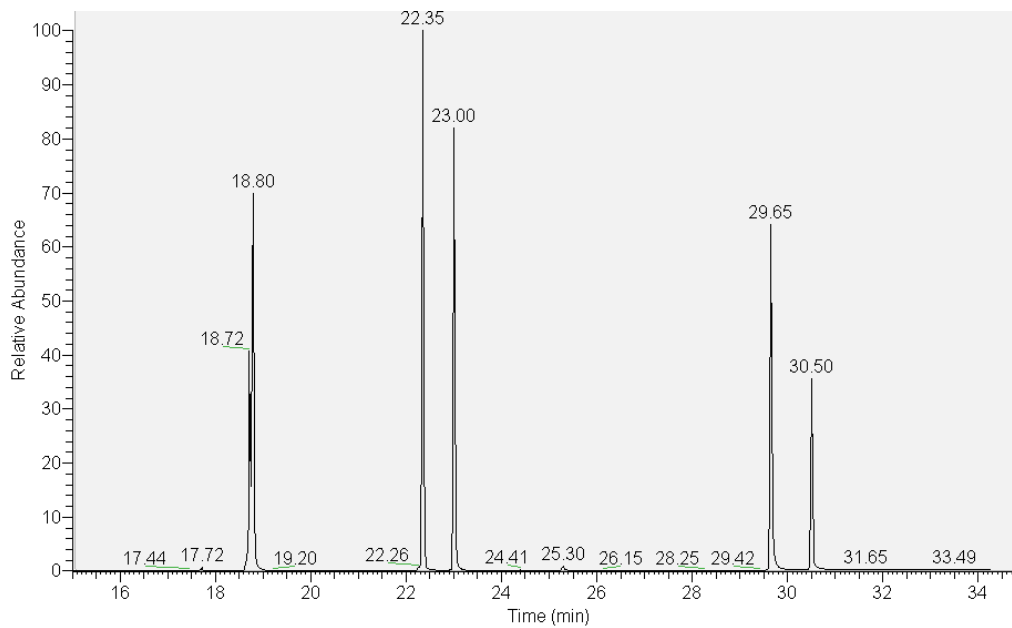
EXEMPLE D'ALGUNS CROMATOGRAMES OBTINGUTS DE L'ANÀLISI PER GC/MS D'ALGUNS MICROCOSMOS PREPARATS PER L'ESTUDI DE LA INFLUÈNCIA DE DIFERENTS CONCENTRACIONS DE METALLS PESANTS EN LA DEGRADACIÓ DELS PAHs



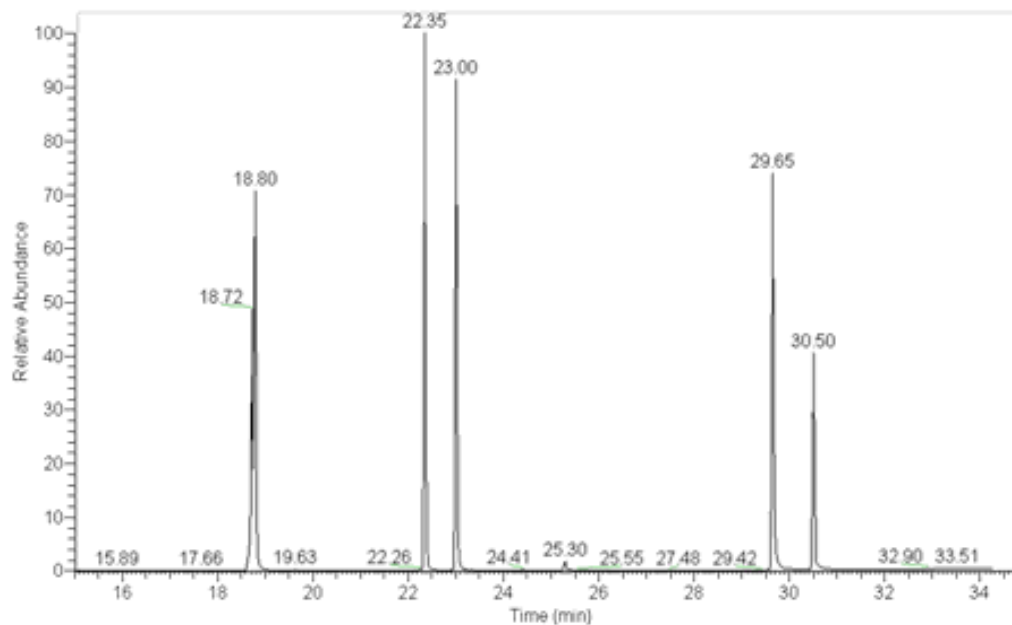
Separació dels 5 PAHs d'estudi (+patró intern), a **temps 0 dies**, corresponent al **blanc**. Pics: Phe-D₁₀ (18,72), Phe (18,80), Fluo (22,35), Pyr (23,00), BbF (29,65), BaP (30,50).



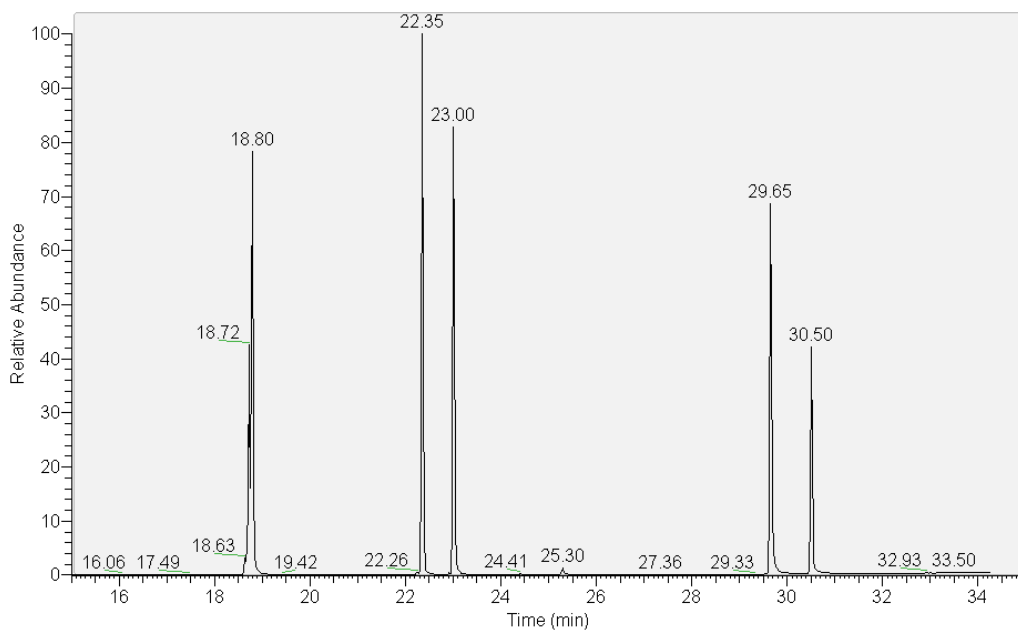
Separació dels 5 PAHs d'estudi (+patró intern), a **temps 0 dies**, corresponent al nivell **no dopat amb HM**. Pics: Phe-D₁₀ (18,72), Phe (18,80), Fluo (22,35), Pyr (23,00), BbF (29,65), BaP (30,50)



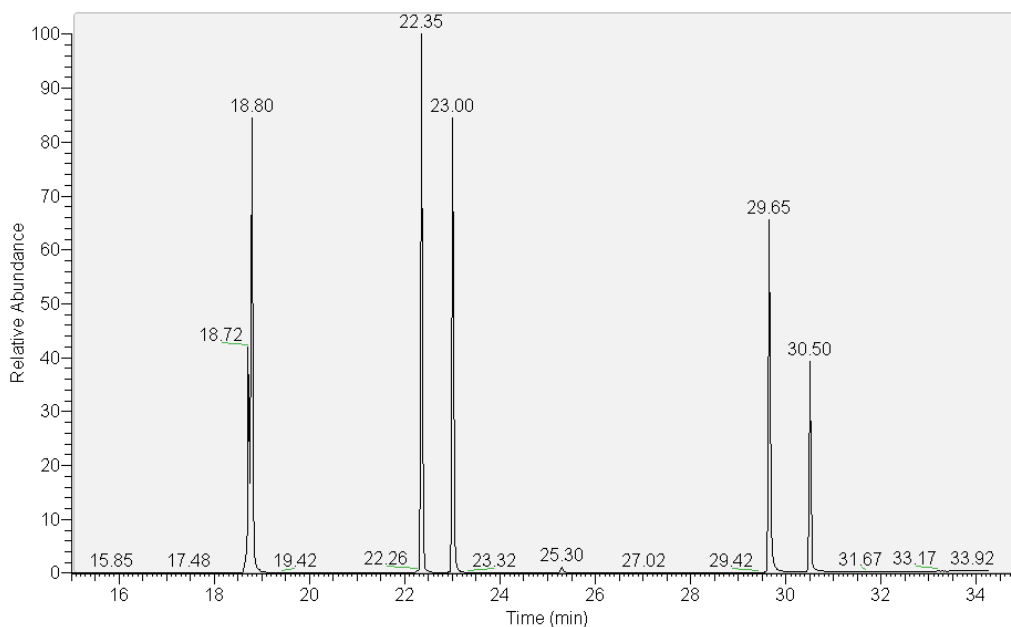
Separació dels 5 PAHs d'estudi (+patró intern), a **temps 0 dies**, corresponent al nivell dopat amb **x10 HM**. Pics: Phe-D10 (18,72), Phe (18,80), Fluo (22,35), Pyr (23,00), BbF (29,65), BaP (30,50)



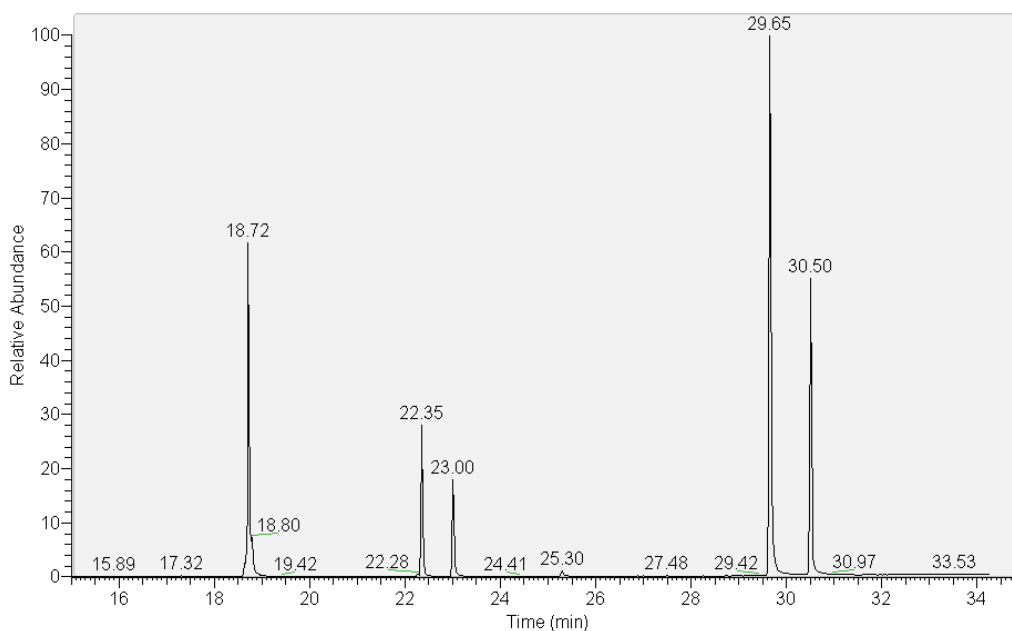
Separació dels 5 PAHs d'estudi (+patró intern), a **temps 0 dies**, corresponent al nivell dopat amb **x250 HM**. Pics: Phe-D10 (18,72), Phe (18,80), Fluo (22,35), Pyr (23,00), BbF (29,65), BaP (30,50)



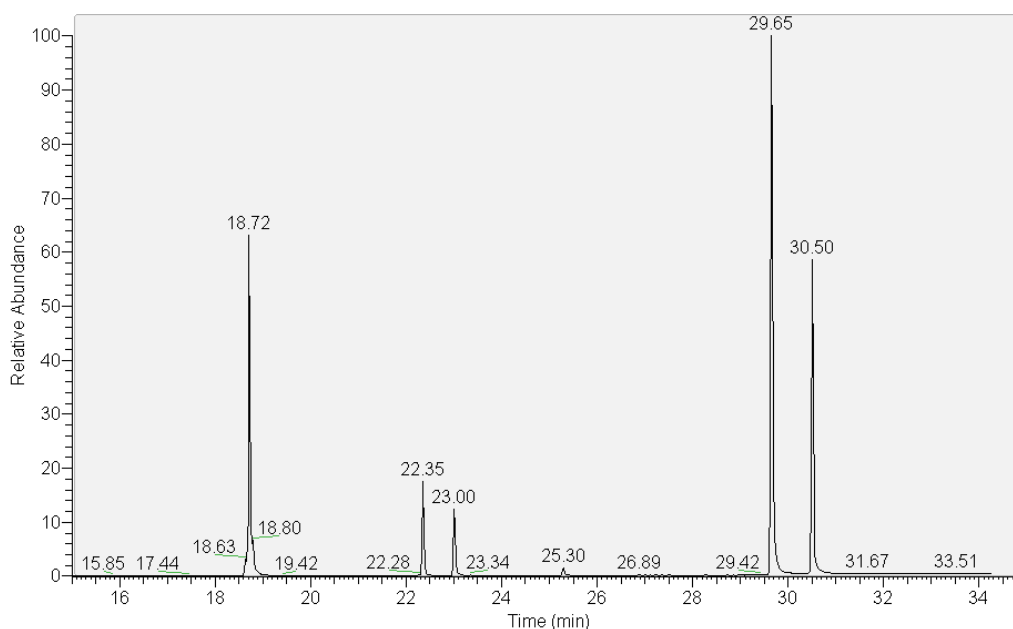
Separació dels 5 PAHs d'estudi (+patró intern), a **temps 0 dies**, corresponent al nivell dopat amb **x500 HM**. Pics: Phe-D10 (18,72), Phe (18,80), Fluo (22,35), Pyr (23,00), BbF (29,65), BaP (30,50)



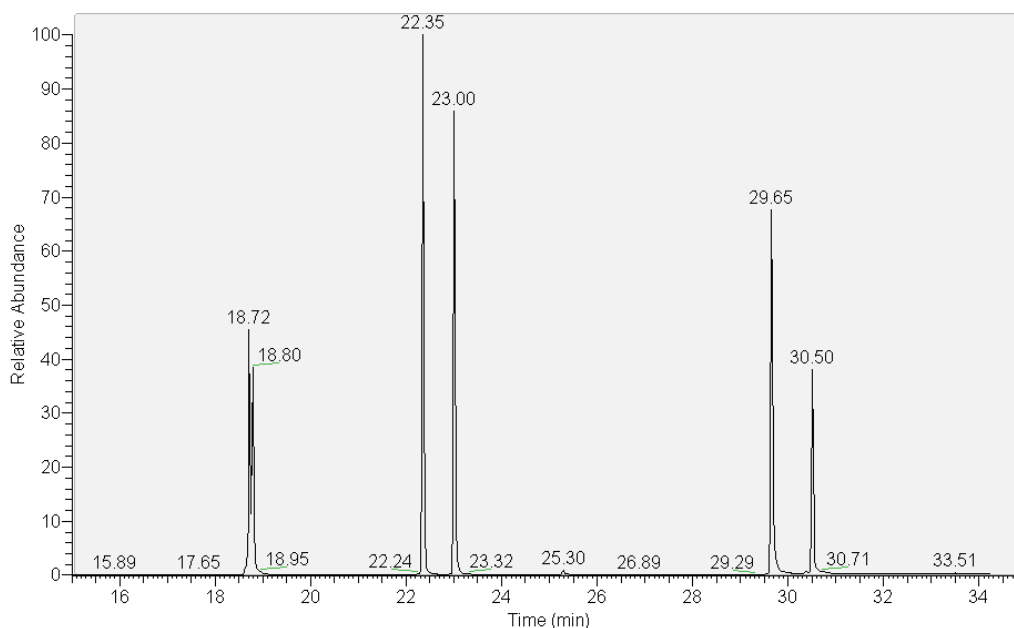
Separació dels 5 PAHs d'estudi (+patró intern), a **temps 15 dies**, corresponent al **blanc**. Pics: Phe-D10 (18,72), Phe (18,80), Fluo (22,35), Pyr (23,00), BbF (29,65), BaP (30,50)



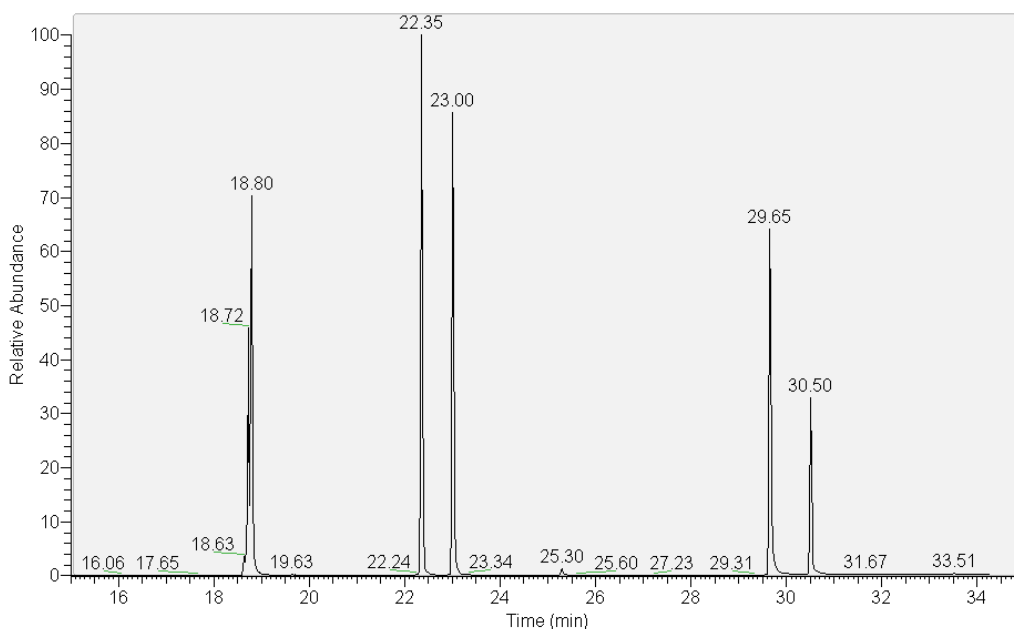
Separació dels 5 PAHs d'estudi (+patró intern), a **temps 15 dies**, corresponent al nivell **no dopat amb HM**. Pics: Phe-D10 (18,72), Phe (18,80), Fluo (22,35), Pyr (23,00), BbF (29,65), BaP (30,50)



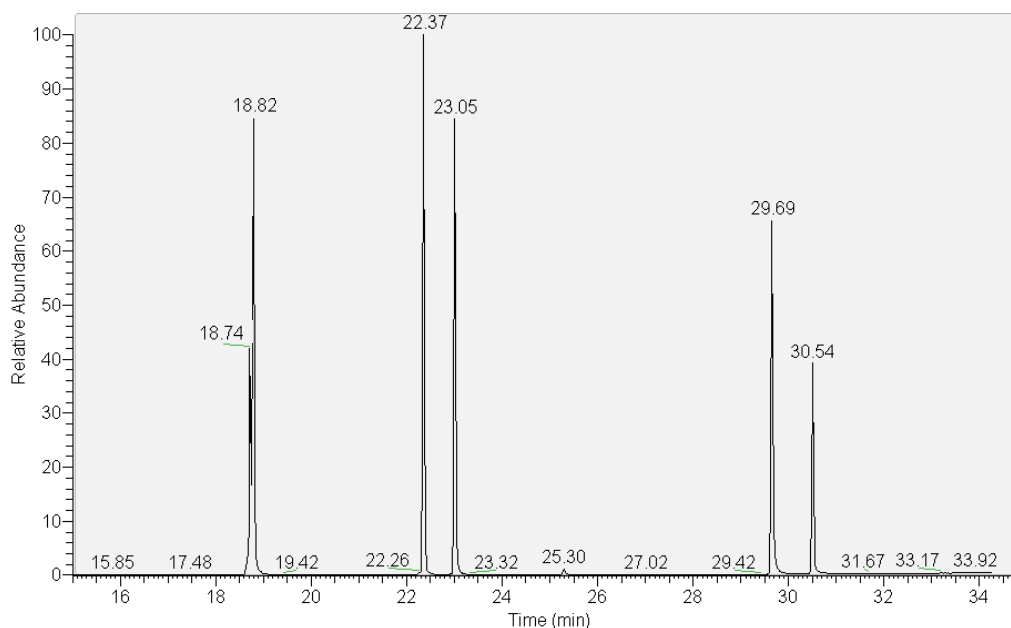
Separació dels 5 PAHs d'estudi (+patró intern), a **temps 15 dies**, corresponent al nivell **dopat amb x10 HM**. Pics: Phe-D10 (18,72), Phe (18,80), Fluo (22,35), Pyr (23,00), BbF (29,65), BaP (30,50)



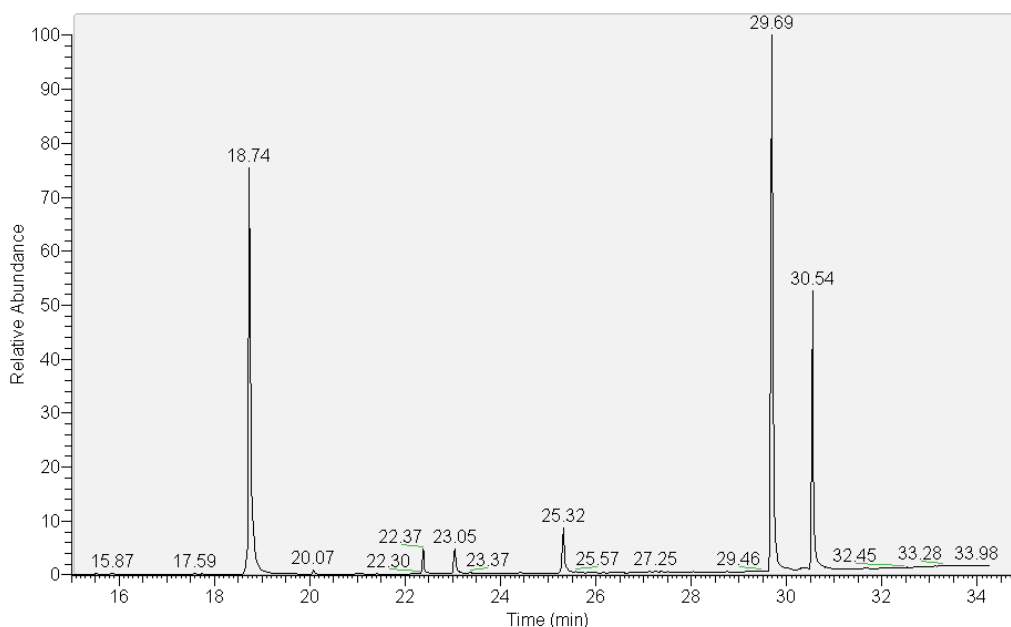
Separació dels 5 PAHs d'estudi (+patró intern), a **temps 15 dies**, corresponent al nivel dopat amb **x250 HM**. Pics: Phe-D10 (18,72), Phe (18,80), Fluo (22,35), Pyr (23,00), BbF (29,65), BaP (30,50)



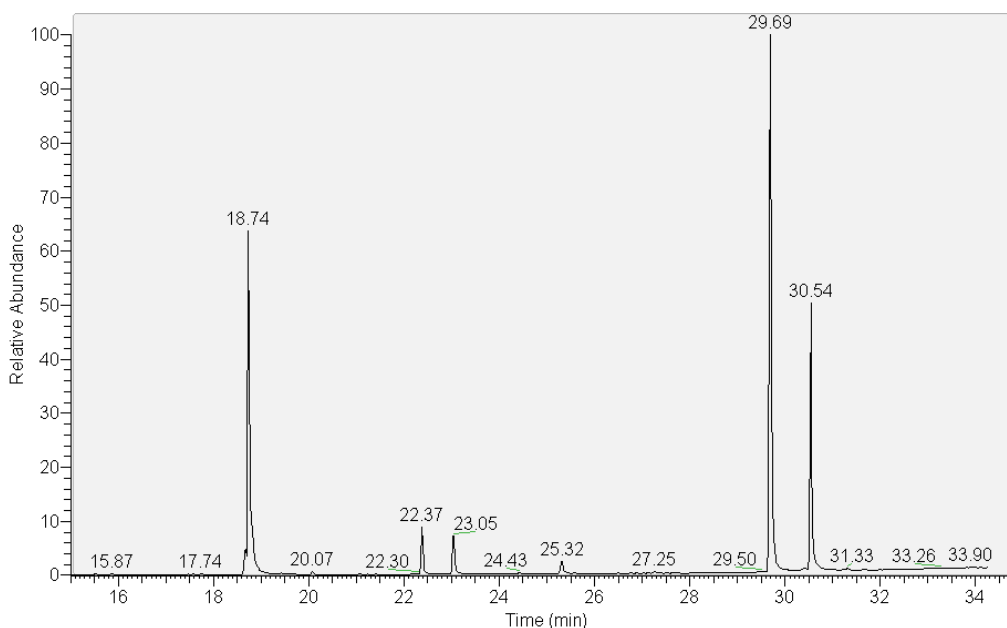
Separació dels 5 PAHs d'estudi (+patró intern), a **temps 15 dies**, corresponent al nivel dopat amb **x500 HM**. Pics: Phe-D10 (18,72), Phe (18,80), Fluo (22,35), Pyr (23,00), BbF (29,65), BaP (30,50)



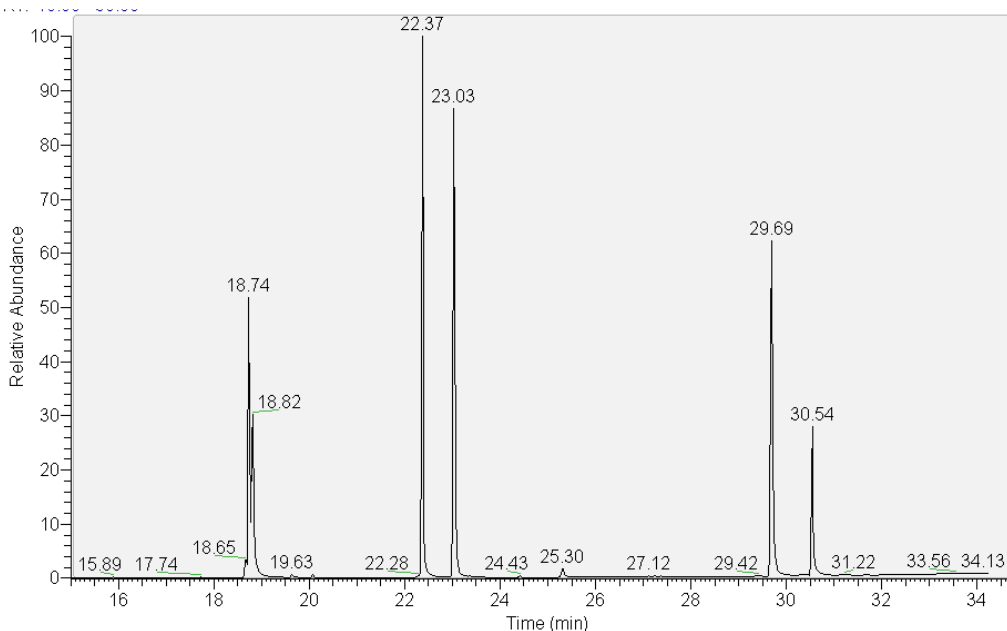
Separació dels 5 PAHs d'estudi (+patró intern), a **temps 60 dies**, corresponent al **blanc**. Pics: Phe-D10 (18,74), Phe (18,82), Fluo (22,37), Pyr (23,05), BbF (29,69), BaP (30,54)



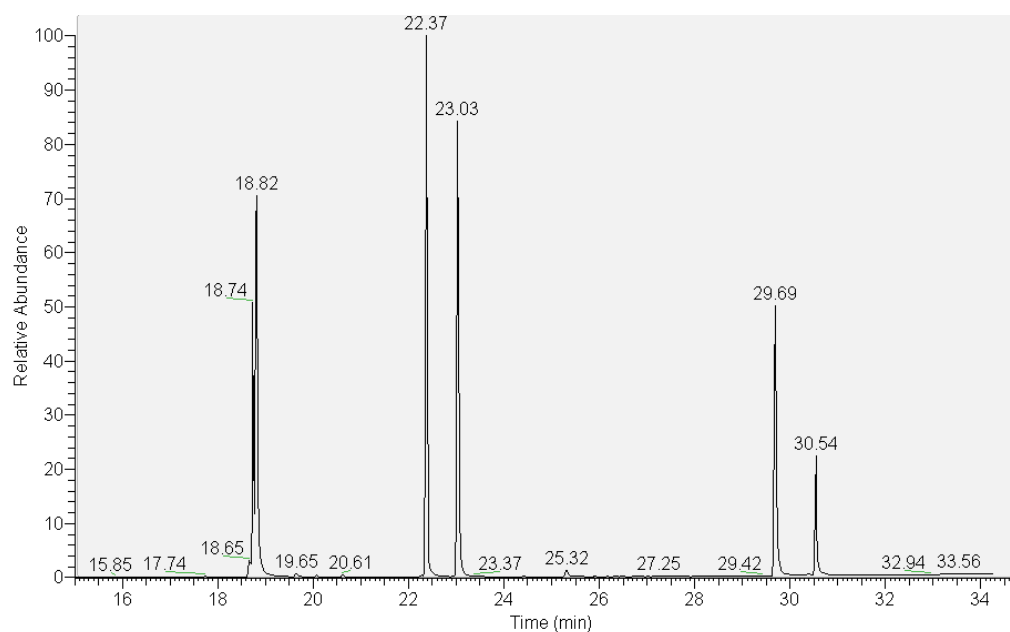
Separació dels 5 PAHs d'estudi (+patró intern), a **temps 60 dies**, corresponent al **nivell no dopat amb HM**. Pics: Phe-D10 (18,74), Phe (no observat, cal filtrar per la massa 178), Fluo (22,37), Pyr (23,05), BbF (29,69), BaP (30,54)



Separació dels 5 PAHs d'estudi (+patró intern), a **temps 60 dies**, corresponent al nivell dopat **amb x10HM**. Pics: Phe-D10 (18,74), Phe (no observat, cal filtrar per la massa 178), Fluo (22,37), Pyr (23,05), BbF (29,69), BaP (30,54)



Separació dels 5 PAHs d'estudi (+patró intern), a **temps 60 dies**, corresponent al nivell dopat **amb x250HM**. Pics: Phe-D10 (18,74), Phe (18,82), Fluo (22,37), Pyr (23,03), BbF (29,69), BaP (30,54)



Separació dels 5 PAHs d'estudi (+patró intern), a **temps 60 dies**, corresponent al nivell dopat **amb x500HM**. Pics: Phe-D10 (18,74), Phe (18,82), Fluo (22,37), Pyr (23,03), BbF (29,69), BaP (30,54)

